



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0077237

(43) 공개일자 2015년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/65 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0166224

(22) 출원일자 2013년12월27일

심사청구일자 2013년12월27일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

박우준

서울특별시 성북구 길음로 119 대우푸르지오아파트 221-504호

홍혜림

서울특별시 은평구 불광로 64, 107동 302호 (불광동 롯데캐슬아파트)

(74) 대리인

특허법인다나, 김전애

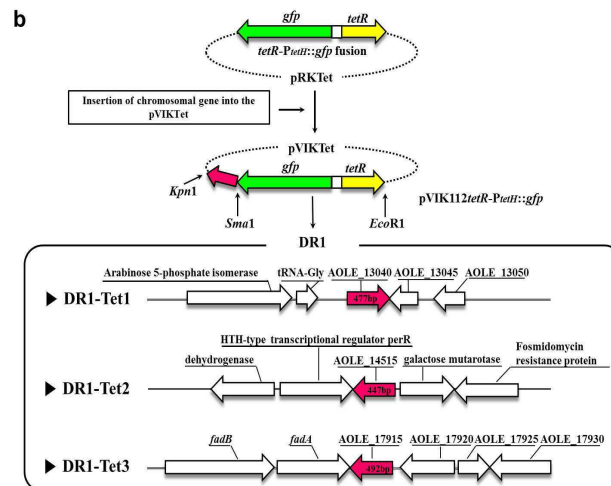
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 테트라사이클린 저항성 유전자를 이용한 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서 균주

(57) 요약

본 발명은 서열번호 2의 염기서열을 갖는 테트라사이클린 프로모터 (*tetH*), 오퍼레이터 및 테트라사이클린 억제자(*tetR*); 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 재조합 벡터, 그리고 이를 포함한 대장균(*Escherichia coli*) 또는 아시네박터 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1, 기탁번호 KACC91414P) 바이오센서 균주를 제공한다. 본 발명에 의하면, 테트라사이클린 계열 항생제를 특징적으로 신속, 정확하고 효율적으로 탐지할 수 있고, 특히 오염된 환경에서도 안정적으로 테트라사이클린 계열 항생제를 탐지할 수 있다.

대표도 - 도1b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0015688

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 환경유래 Acinetobacter 세균의 비돌연변이성 항생제 저항성 기작 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 염기서열을 갖는 테트라사이클린 프로모터 (*tetH*), 오퍼레이터 및 테트라사이클린 억제자(*tetR*); 및

상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항 기재의 재조합 벡터를 포함하는 플라스미드가 도입된 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서 균주.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 균주는 대장균(*Escherichia coli*) 또는 아시네박터 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1, 기탁번호 KACC91414P)인 것을 특징으로 하는 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서 균주.

청구항 4

제1항 기재의 재조합 벡터를 아시네박터 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1, 기탁번호 KACC91414P)의 염색체에 상동 재조합으로 도입하여 제조된 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서 균주.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 상동 재조합은 상기 아시네박터 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1)의 AOLE_13040 유전자, AOLE_14515 유전자 또는 AOLE_17915 유전자를 이용하는 것을 특징으로 하는 제조된 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서 균주.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 테트라사이클린 저항성 유전자를 이용한 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서 균주에 관한 것이며, 더욱 상세하게는 테트라사이클린 계열 항생제를 효율적으로 탐지할 수 있는 플라스미드 기반 바이오리포터 및 유기용매의 존재 등 오염된 환경에서도 안정적으로 테트라사이클린 계열 항생제를 탐지할 수 있는 염색체 기반으로 유전적으로 개조한 바이오센서 균주에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

테트라사이클린 계열 항생제 (Tetracyclines, TCs)는 의약품뿐 아니라 농업 및 양식업 등 여러 분야에 걸쳐 다양한 용도로 사용되고 있다 (Chopra and Roberts, 2001). 항생제의 광범위한 적용 때문에 하수처리장이나 경작지, 지표수와 같은 다양한 환경에서 TCs이 검출되고 있다 (Lindsey et al 2001; Zhu et al 2001; Hamscher et al. 2002; Miao et al. 2004). 그 중에 테트라사이클린 (Tetracycline, TC)이나 클로르테트라사이클린 (chlortetracycline, CTC)은 액체상 거름에서 각각 9 μM 과 0.2 μM 까지 검출되었으며, 이것을 경작지에 적용 시 전파될 가능성이 크다. 환경조건에 따라서 TCs와 그 잔여물은 0.19 ~ 0.45 μM 까지 존재할 수 있음이 밝혀진 바 있으며(Hamscher et al. 2002), TCs를 정량할 수 있는 다양한 방법이 고안되었다.

[0003]

일반적으로는 액체크로마토그래피를 이용한 방법이 널리 쓰이나(Lindsey et al. 2001; Sengelov et al. 2003;

Yang et al. 2004), 시간과 비용이 많이 드는 문제점이 있다. 또한 생물학적인 방법으로서 박테리아 억제 분석법(bacterial inhibition assays, Perrin-Guyomard et al. 2001)이나 테트라사이클린에 의해 촉진되는 프로모터(P_{tet})와 그를 조절하는 유전자 (*tetR*)를 융합한 바이오리포터가 적용가능하다.

[0004]

미생물 바이오리포터는 조절되는 프로모터와 리포터 유전자(reporter gene)로 전사용합되어 여러 종류의 물질들을 탐지할 수 있도록 설계되었다 (Hansen and Sorensen, 2001; van der Meer and Belkin, 2010). 바이오리포터는 *lacZ*, *lucFF*, *lucGR*, *lux*, *gfp*, *crtA*를 마커유전자로 사용하며, 그 발현은 각각 β -galactosidase activity, luminescence, green fluorescent protein (GFP) fluorescence, colorimetry으로 측정이 가능하다 (Engbrecht et al. 1985; Wood et al. 1989; Meighen, 1991; Devine et al. 1993; Prasher, 1995; Hansen and Sorensen 2000; Hansen et al. 2002; Shaner et al. 2004; Yagi, 2007; Shaner et al. 2008). GFP 융합 바이오리포터는 다음과 같은 장점을 가진다. (1) GFP는 세포 안으로 축적되어 매우 안정하며, (2) 추가적인 기질이 필요하지 않고, (3) 다양한 호스트 셀(host cell)에서 발현할 수 있다 (Heitzer et al, 1994; Suarez et al, 1997; Andersen et al, 1998).

[0005]

최근의 연구에서 바이오리포터는 *E. coli*(Lee et al. 2013), *Pseudomonas fluorescens* (Chauhan et al. 2011), *Pseudomonas putida* (Muller and Fetzner, 2013)를 포함한 제한된 박테리아에서 연구되어 왔다. 또한 바이오리포터 플라스미드(plasmid)의 사용은 클로닝 벡터의 호스트 범위(host range)의 한계로 제한되어 왔다.

[0006]

한편, 많은 항생제 방출 단백질(antibiotic efflux proteins)이 접합성 플라스미드에 의해 코딩되며, 이것이 박테리아간에 항생제 저항성 증가에 기여한다는 사실이 알려져 있다(Chopra and Roberts 2001). 그람-음성 방출 단백질(Gram-negative efflux proteins)의 발현은 다양한 전사억제유전자에 의해 조절되며, 이 유전자들은 TetR family에 속해 있다 (George and Levy, 1983; Hillen and Berens, 1994; Hinrichs et al., 1994; Poole, 2007). 가장 잘 알려진 방출 시스템(eflux system)은 그람-음성 TetA 단백질(Gram-negative TetA protein)로, 박테리아 세포에서 TC가 번역을 억제하기 전에 항생제를 외부로 반출하는 역할을 한다(Kaneko et al., 1985; Levy et al., 1999). 이전 연구에서, palindromic DNA operator (5'-TCT ATC ATT GAT AGG-3')가 *tetR*, *tetA* 유전자 사이의 유전자간 영역(intergenic region)에서 발견되었고(Orth et al., 2000), 이 오퍼레이터에 TetR이 결합되면 양 유전자의 발현이 억제된다.

[0007]

상기와 같은 TC-유도 유전자 조절을 이용한 바이오리포터가 연구되고 있다. *tetO-tetR*의 경우 *lux* gene system과 융합되어 *Mycobacterium* species에서 40 배의 높은 형광 발현을 보였다(Blokpoel et al., 2005; Carroll et al., 2005; Williamset al., 2010). 한 연구에서는 TC 바이오센서를 음용수에 첨가하여 쥐의 장내를 통과할 때 항생제를 탐지할 수 있도록 제작되었다. pTGF2를 포함하는 *E. coli* 바이오센서는 TC-유도 프로모터 (P_{tetM})와 GFP 유전자가 융합된 형태이다(Bahl et al., 2004). 또한, 분변에서의 CTC의 농도를 β -galactosidase 신호로 측정할 수 있는 *E. coli* 바이오리포터가 제작된바 있다(Hansen et al., 2002). 대부분의 테트라사이클린 탐지용 바이오리포터 시스템은 *E. coli* strains과 *tetA-tetR* module을 이용하여 제작되었다 (Hansen and Soensen, 2000). 그 결과로 GFP가 10 ng/ml의 TC (0.02 μ M)를 탐지할 수 있었으며, pTGF2를 포함하는 바이오리포터의 경우, 5 ng/ml (0.01 μ M)의 TC를 최소농도로 탐지할 수 있었다(Bahl et al., 2005). 바이오리포터 플라스미드의 사용은 종종 호스트 범위(host range)의 문제로 사용 균주가 제한되어왔다.

[0008]

본 발명의 배경이 되는 기술의 일 예로는, 대한민국 등록특허 제10-1065959호(2011.09.19)에는 탄화수소계 유류 분해 아시네토박터 속 DR1 균주 및 이를 이용한 향상된 유류 분해 방법에 대해 기재되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-0841536호(2008.06.26)에는 페닐아세트산 분해 유전자를 이용한 페닐아세트산 탐지용바이오센서 균주에 대해 기재되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-0655792호(2006.12.08)에는 산화적 스트레스 탐지용 유전자 구조체 및 이를 이용한 바이오센서에 대해 기재되어 있다.

[0009]

그러나, 현재 하수처리장이나 환경에서 널리 분포되어 있는 항생제 잔여물질의 탐지에 대한 기술개발이 부족한 실정이고, 그 중 가축항생제로 널리 이용되는 테트라사이클린을 탐지할 수 있는 기술 개발이 요구된다. 나아가 오염된 환경에서도 안정적으로 테트라사이클린계 항생제를 탐지할 수 있는 바이오센서에 대해서는 알려진 바는 없다.

[0010]

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허가 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1065959호(2011.09.19)
 (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-0841536호(2008.06.26)
 (특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제10-0655792호(2006.12.08)

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) Andersen JB, Sternberg C, Poulsen LK, Bjorn SP, Givskov M, Molin S (1998) New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64:2240-2246.
- (비특허문헌 0002) Bahl MI, Hansen LH, Licht TR, Sorensen SJ (2004) In vivo detection and quantification of tetracycline by use of a whole-cell biosensor in the rat intestine. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1112-1117.
- (비특허문헌 0003) Bahl MI, Hansen LH, Sorensen SJ (2005) Construction of an extended range whole-cell tetracycline biosensor by use of the tet(M) resistance gene. *FEMS Microbiol Lett* 253:201-205.
- (비특허문헌 0004) Blokpoel MC, Murphy HN, O'Toole R, Wiles S, Runn ES, Stewart GR, Young DB, Robertson BD (2005) Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria. *Nucleic Acids Res* 33:e22.
- (비특허문헌 0005) Blanco M, Kadlec K, Gutierrez Martin CB, de la Fuente AJ, Schwarz S, Navas J (2007) Nucleotide sequence and transfer properties of two novel types of *Actinobacillus pleuropneumoniae* plasmids carrying the tetracycline resistance gene tet(H). *J Antimicrob Chemother* 60:864-867.
- (비특허문헌 0006) Carroll P, Muttucumaru DG, Parish T (2005) Use of a tetracycline-inducible system for conditional expression in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Appl Environ Microbiol* 71:3077-3084.
- (비특허문헌 0007) Chauhan A, Layton AC, Williams DE, Smartt AE, Ripp S, Karpinets TV, Brown SD, Saylor GS (2011) Draft genome sequence of the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading, genetically engineered bioluminescent bioreporter *Pseudomonas fluorescens* HK44. *J Bacteriol* 193:5009-5010.
- (비특허문헌 0008) Chopra I, Roberts M (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:232-260.
- (비특허문헌 0009) Devine JH, Kutuzova GD, Green VA, Ugarova NN, Baldwin TO (1993) Luciferase from the east European firefly *Luciola mingrelica*: cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1173:121-132.
- (비특허문헌 0010) Engebrecht J, Simon M, Silverman M (1985) Measuring gene expression with light. *Science* 227:1345-1347.
- (비특허문헌 0011) George AM, Levy SB (1983) Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J Bacteriol* 178:2507-2513.
- (비특허문헌 0012) Hamscher G, Sczesny S, Hoper H, Nau H (2002) Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 74:1509-1518.
- (비특허문헌 0013) Hansen LM, McMurtry LM, Levy SB, Hirsh DC (1993) A new tetracycline resistance determinant, TetH, from *Pasteurella multocida* specifying active efflux of tetracycline. *Antimicrob*

Agents Chemother 37:2699-2705.

(비특허문헌 0014) Hansen LH, Sorensen SJ (2000) Detection and quantification of tetracyclines by whole cell biosensors. FEMS Microbiol Lett 190:273-278.

(비특허문헌 0015) Hansen LH, Sorensen SJ (2001) The use of whole-cell biosensors to detect and quantify compounds or conditions affecting biological systems. Microb Ecol 42:483-494.

(비특허문헌 0016) Hansen LH, Aarestrup F, Sorensen SJ (2002) Quantification of bioavailable chlortetracycline in pig feces using a bacterial whole-cell biosensor. Vet Microbiol 87:51-57.

(비특허문헌 0017) Heitzer A, Malachowsky K, Thonnard JE, Bienkowski PR, White DC, Sayler GS (1994) Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. Appl Environ Microbiol 60:1487-1494.

(비특허문헌 0018) Hillen W, Berens C (1994) Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. Annu Rev Microbiol 48:345-369.

(비특허문헌 0019) Hinrichs W, Kisker C, Duvel M, Muller A, Tovar K, Hillen W, Saenger W (1994) Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. Science 264:418-420.

(비특허문헌 0020) Jung J, Baek JH, Park W (2010) Complete genome sequence of the diesel-degrading Acinetobacter sp. strain DR1 J Bacteriol 192:4794-4795.

(비특허문헌 0021) Jung J, Madsen EL, Jeon CO, Park W (2011) Comparative genomic analysis of Acinetobacter oleivorans DR1 to determine strain-specific genomic regions and gentisate biodegradation. Appl Environ Microbiol 77:7418-7424.

(비특허문헌 0022) Jung J, Noh J, Park W (2011) Physiological and metabolic responses for hexadecane degradation in Acinetobacter oleivorans DR1. J Microbiol 49:208-215.

(비특허문헌 0023) Jung J, Yeom J, Kim J, Han J, Lim HS, Park H, Hyun S, Park W (2011) Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. Res Microbiol 162:1018-1026.

(비특허문헌 0024) Kalogeraki VS, Winans SC (1997) Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. Gene 188:69-75.

(비특허문헌 0025) Kaneko M, Yamaguchi A, Sawai T (1983) Energetics of tetracycline efflux system encoded by Tn10 in Escherichia coli. FEBS Lett 193:194-198.

(비특허문헌 0026) Kang YS, Jung J, Jeon CO, Park W (2011) Acinetobacter oleivorans sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. J Microbiol 49:29-34.

(비특허문헌 0027) Kang YS, Lee Y, Jung H, Jeon CO, Madsen EL, Park W (2007) Overexpressing antioxidant enzymes enhances naphthalene biodegradation in Pseudomonas sp. strain AS2. Microbiology 153:3246-3254.

(비특허문헌 0028) Kang YS, Park W (2010) Trade-off between antibiotic resistance and biological fitness in Acinetobacter sp. strain DR1. Environ Microbiol 12:1304-1318.

(비특허문헌 0029) Kehrenberg C, Werckenthin C, Schwarz S (1998) Tn5706 a transposon-like element from Pasteurella multocida mediating tetracycline resistance. Antimicrob Agents Chemother 42:2116-2118.

(비특허문헌 0030) Kehrenberg C, Schwarz S (2000) Identification of a truncated, but functionally active tet(H) tetracycline resistance gene in Pasteurella aerogenes and Pasteurella multocida. FEMS Microbiol Lett 188:191-195.

(비특허문헌 0031) Kehrenberg C, Salmon SA, Watts JL, Schwarz S (2001) Tetracycline resistance genes

in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of plasmid pMHT1. *J Antimicrob Chemother* 48:631-640.

(비특허문헌 0032) Kehrenberg C, Tham NT, Schwarz S (2003) New plasmid-borne antibiotic resistance gene cluster in *Pasteurella multocida*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2978-2980.

(비특허문헌 0033) Kim JM, Jeon CO (2009) Isolation and characterization of a new benzene, toluene, and ethylbenzene degrading bacterium, *Acinetobacter* sp. B113. *Curr Microbiol* 58:70-75.

(비특허문헌 0034) Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM 2nd, Peterson KM (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16:800-802.

(비특허문헌 0035) Lee S, Amasia M, Madou M, Mitchell RJ (2013) Serum complement enhances the responses of genotoxin- and oxidative stress-sensitive *Escherichia coli* bioreporters. *Biosens Bioelectron* 46:175-182.

(비특허문헌 0036) Levy SB, McMurtry LM, Barbosa TM, Burdett V, Courvalin P, Hillen W, Roberts MC, Rood JI, Taylor DE (1999) Nomenclature for New Tetracycline Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1523-1524.

(비특허문헌 0037) Lindsey ME, Meyer TM, Thurman EM (2001) Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 73:4640-4646.

(비특허문헌 0038) Meighen EA (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev* 55:123-142.

(비특허문헌 0039) Miao XS, Bishay F, Chen M, Metcalfe CD (2004) Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environ Sci Technol* 38:3533-3541.

(비특허문헌 0040) Muller C, Fetzner S (2013) A *Pseudomonas putida* bioreporter for the detection of enzymes active on 2-alkyl-4(1H)-quinolone signalling molecules. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:751-760.

(비특허문헌 0041) Orth P, Schnappinger D, Hillen W, Saenger W, Hinrichs W (2000) Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat Struct Biol* 7:215-259.

(비특허문헌 0042) Park J, Park W (2011) Phenotypic and physiological changes in *Acinetobacter* sp. strain DR1 with exogenous plasmid. *Curr Microbiol* 62:249-254.

(비특허문헌 0043) Perrin-Guyomard A, Cottin S, Corpet DE, Boisseau J, Poul JM (2001) Evaluation of residual and therapeutic doses of tetracycline in the human-flora-associated (HFA) mice model. *Regul Toxicol Pharmacol* 34:125-136.

(비특허문헌 0044) Poole K (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 39:162-176.

(비특허문헌 0045) Popowska M, Rzezzycka M, Miernik A, Krawczyk-Balska A, Walsh F, Duffy B (2012) Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1434-1443.

(비특허문헌 0046) Prasher DC (1995) Using GFP to see the light. *Trends Genet* 11:320-323.

(비특허문헌 0047) Rysz M, Mansfield WR, Fortner JD, Alvarez PJ (2013) Tetracycline resistance gene maintenance under varying bacterial growth rate, substrate and oxygen availability, and tetracycline concentration. *Environ Sci Technol* 47:6995-7001.

(비특허문헌 0048) Sengelov G, Agerso Y, Halling-Sorensen B, Baloda SB, Andersen JS, Jensen LB (2003) Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure

slurry. Environ Int 28:587-595.

(비특허문헌 0049) Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. Nat Biotech 22:1567-1572.

(비특허문헌 0050) Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, Tsien RY (2008) Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. Nat Methods 5:545-551.

(비특허문헌 0051) Simon R, Preifer U, Puhler A (1983) A broad host range mobilisation system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Nat Biotech 1:784-791.

(비특허문헌 0052) Suarez A, Gittler A, Stratz M, Staendner LH, Timmis KN, Guzman CA (1997) Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. Gene 196:69-74.

(비특허문헌 0053) van der Meer JR, Belkin S (2010) Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. Nat Rev Microbiol 8:511-522.

(비특허문헌 0054) Watanabe K, Kodama Y, Harayama S (2001) Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. J Microbiol Methods 44:253e262.

(비특허문헌 0055) Williams KJ, Joyce G, Robertson BD (2010) Improved mycobacterial tetracycline inducible vectors. Plasmid 64:69-73.

(비특허문헌 0056) Wood KV, Lam YA, Seliger HH, McElroy WD (1989) Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors. Science 244:700-702.

(비특허문헌 0057) Yagi K (2007) Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. Appl Microbiol Biotechnol 73:1251-1258.

(비특허문헌 0058) Yang S, Cha J, Carlson K (2004) Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 18:2131-2145.

(비특허문헌 0059) Yin S, Fuangthong M, Laratta WP, Shapleigh JP (2003) Use of a green fluorescent protein-based reporter fusion for detection of nitric oxide produced by denitrifiers. Appl Environ Microb 69:3938-3944.

(비특허문헌 0060) Zhu J, Snow DD, Cassada DA, Monson SJ, Spalding RF (2001) Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 928:177-186.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명자들은 하수처리장에서 발견한 새로운 플라스미드 pAST2에서 테트라사이클린 저항성 유전자를 확인하여 이를 유기용매 등으로 오염된 환경에서 저항성을 지니는 아시네박토 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1)과 대장균(*E. coli*) 도입하여 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서로서의 기능을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0014] 따라서, 본 발명의 목적은 테트라사이클린 계열 항생제를 효율적으로 탐지할 수 있는 재조합 벡터 및 이를 포함 플라스미드 기반 바이오리포터를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은 유기용매 존재 등 오염된 환경에서도 안정적으로 테트라사이클린 계열 항생제를 탐지할

수 있는 염색체를 기반으로 유전적으로 개조한 바이오센서 균주를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 염기서열을 갖는 테트라사이클린 프로모터 (*tetH*), 오퍼레이터 및 테트라사이클린 억제자(*tetR*); 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 재조합 벡터를 제공한다.

[0018] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 포함하는 플라스미드가 도입된 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서 균주를 제공한다.

[0019] 본 발명의 구체적인 양태에 의하면, 본 발명의 상기 균주는 대장균(*Escherichia coli*) 또는 아시네박터 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1, 기탁번호 KACC91414P)인 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 아시네박터 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1, 기탁번호: KACC91414P)의 염색체에 상동 재조합으로 도입하여 제조된 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서 균주를 제공한다.

[0021] 본 발명의 구체적인 양태에 의하면, 본 발명의 상기 상동 재조합은 상기 아시네박터 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1, 기탁번호 KACC91414P)의 AOLE_13040 유전자, AOLE_14515 유전자 또는 AOLE_17915 유전자를 이용하는 것을 특징으로 한다.

[0022] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명한다.

[0023] 본 발명자들은 하수처리장에서 발견한 새로운 플라스미드 pAST2에서 테트라사이클린 저항성 유전자를 확인하여 이를 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서에 적용하게 되었다. 바이오리포트의 호스트로서, 유기용매로 오염된 환경에서 저항성을 지니는 아시네박토 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1)과 대장균(*E. coli*)을 비교하였다. *A. 올레이보란스*(*A. oleivorans*)는 알칸(alkanes)의 탄소사슬과 방향족 물질을 분해할 수 있는 것으로 알려져 왔다 (Kim and Jeon, 2009; Jung et al. 2010; Kang and Park, 2010; Jung et al. 2011; Kang et al. 2011). 유기용매 저항성 바이오리포트의 발현은 *E. coli* 기반의 리포트와는 다르게 오염된 환경에서의 TC 탐지에도 적합할 것으로 예상되어, 본 발명자들은 두 가지의 광범위 플라스미드(broad-range plasmid)에 기반한 TC 리포터를 두 가지의 다른 균주에 제작하여 효율을 평가하고 검출범위를 정하였다. 또한 *A. oleivorans*의 염색체에 리포터유전자와 억제조절자 및 대상 프로모터를 상동 재조합한 리포터는 장시간의 안정성을 주었으며, 실제 활성슬러지에서 DC 등을 탐지할 수 있는 기능적인 바이오리포트임이 확인하여 본 발명을 완성하였다(표 1).

[0024] 따라서 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 테트라사이클린 저항성 플라스미드 pAST2를 제공한다. 플라스미드 서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank에 KC734561으로 등록되어있다 (Microbial Ecology, doi:10.1007/s00248-013-0343-8).

[0025] 본 발명에 의한 플라스미드 pAST2는 여러 유전자와 함께 *tetR* (624bp)과 *tetH* (1,203bp) 유전자를 포함하고 있다(표 2). 프로모터와 오퍼레이터를 포함하고 있는 *tetH*와 *tetR* 사이의 유전자간 영역(intergenic region, 91bp)은 *tetR* 억제자(repressor)에 인접해 있다(도 1a). 본 발명에 의한 *tetH-tetR* module에서 발견된 오퍼레이터(operator)는 신규한 것으로 확인되었다(5'-TCT ATC AGT GAT AGA-3').

[0026] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 상기 플라스미드 pAST2에서 분리된 서열번호 2의 염기서열을 갖는 테트라사이클린 프로모터 (*tetH*), 오퍼레이터 및 테트라사이클린 억제자(*tetR*)를 포함하는 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 재조합 벡터를 제공한다.

[0027] 상기 재조합 벡터는 바이오리포트 플라스미드 제작과 qRT-PCR 분석에 사용된다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 벡터는 상기 테트라사이클린 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함한다. 상기 리포터 유전자는 공지된 다양한 리포터 유전자가 이용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니나 안정적이고 다른 기질을 필요로 하지 않는 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP) 유전자(Park

and Park, 2011; Yin *et al.*, 2003)가 바람직하다.

- [0029] 상기 재조합 벡터는 특별한 제한이 없으나, 예를 들어 광범위 호스트 적용성 벡터(broad-host-range vector)인 pRK415(GenBank: EF437940.1; Yin *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 2003)와 pBBR1MCS2(Kovach *et al.*, 1995, Gene, 166:175-176)가 이용될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 공지의 두 가지 광범위 플라스미드에 클로닝되어 pRKTet과 pBBRTet이 전사융합으로 제작되었다(도 1a).
- [0030] 본 발명에 있어서, 테트라사이클린 계열 항생제는 예를 들어 테트라사이클린(tetracycline, TC), 독시사이클린(doxycycline, DC), 옥시테트라사이클린(oxytetracycline, OTC), 또는 클로르테트라사이클린(chlortetracycline, CTC)이며, 바람직하게는 독시사이클린(DC)이다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 포함하는 플라스미드가 도입된 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서 균주를 제공한다.
- [0032] 이에 한정되는 것은 아니나, 본 발명에 의한 일 실시예에 의하면 상기 바이오센서 균주는 도 1a에 도시된 pRKTet 또는 pBBRTet 플라스미드가 도입된 플라스미드 기반 바이오센서 균주이다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 호스트 균주는 테트라사이클린 계열 항생제의 존재하에서 리포터 유전자의 발현을 유도할 수 있다면 특별한 제한은 없으나, 본 발명의 상기 균주는 대장균(*Escherichia coli*) 또는 아시네박터 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1)가 바람직하다.
- [0034] DR1 균주는 Korea Collection for Type Cultures (KCTC 23045)와 Japan Collection of Microorganisms (JCM 16667)에 등록되어 있다. 전체서열은 GenBank (accession no. CP002080)에서 확인할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 이에 한정되는 것은 아니나 상기 바이오센서의 반응시간은 1~3시간으로 하는 것이 바람직하다.
- [0036] 본 발명에 의한 바이오센서 균주에 의하면 아주 적은 양의 테트라사이클린 계열 항생제도 특징적으로 신속, 정확하고 효율적으로 검출할 수 있다. 본 발명에서는 pBBR1MCS2 백본 플라스미드 바이오포터를 가지는 *E. coli* 균주가 제일 높은 GFP 발현량을 보였으며, 최소농도로 TCs를 탐지할 수 있었다. pRKTet의 백본 플라스미드, pRK415는 광범위 호스트 적용성 벡터(broad host range vector)로서 그 자체에 *tetA-tetR* modules을 가지고 있어, 상대적으로 TCs에 대한 민감도가 떨어졌을 가능성이 있다. pRKTet-포함 균주는 높은 TC 농도에서 안정적으로 GFP를 발현시키며, 이는 *tetA-tetR* modules이 TC 저항성을 주었기 때문이다.
- [0037] 본 발명에 의한 바이오센서는 DC가 가장 효율적으로 GFP 발현을 고양시키는 것을 확인하였다. 또한 DC의 최소검출농도는 다른 TC 계열 항생제보다 낮은 것을 확인하였다. 즉 *E. coli*와 *A. oleivorans*에 기반한 플라스미드 바이오센서는 각각 5 nM 와 30 nM DC를 최소 농도로 탐지할 수 있다.
- [0038] 나아가 상기 아시네박토 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1)는 유기용매로 오염된 환경에서 저항성이 있으므로, 아시네박토 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1)를 호스트 균주로 사용하면 유기용매 존재 등 오염된 환경에서도 안정적으로 테트라사이클린 계열 항생제를 탐지할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 아시네박터 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1, 기탁번호: KACC91414P)의 염색체에 상동 재조합으로 도입하여 제조된 테트라사이클린 계열 항생제 탐지용 바이오센서 균주를 제공한다.
- [0040] 이에 한정되는 것은 아니나, 본 발명에 의한 일 실시예에 의하면 상기 바이오센서 균주는 도 1b에 도시된 pRKTet가 pVIK112에 삽입되어 제작된 pVIKTet를 이용하여 염색체에 상동 재조합으로 도입된 염색체 기반 바이오센서 균주이다.
- [0041] 본 발명의 구체적인 양태에 의하면, 본 발명의 상기 상동 재조합은 상기 아시네박터 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1, 기탁번호 KACC91414P)의 AOLE_13040 유전자, AOLE_14515 유전자 또는 AOLE_17915 유전자를 이용하는 것을 특징으로 한다(표 4 참조).
- [0042] 상기와 같이 본 발명에 의한 테트라사이클린 계열 항생제의 존재하에서 리포터 유전자의 발현하는 재조합 벡터를 염색체에 상동 재조합으로 도입하면, 플라스미드 기반 바이오센서와 달리 플라스미드 복제수 차이에 따라 또

는 플라스미드 손실에 따라 리포터 유전자의 발현 정도가 달라지는 문제점이 없다.

[0043]

대부분의 플라스미드 기반 바이오리포터는 리포터 플라스미드의 복제수 차이에 따라 리포터유전자의 발현 정도가 달라지며, 플라스미드가 일부 손실되기도 한다(Rysz *et al.*, 2013). 염색체-기반 리포터는 단 하나의 복제수를 가지며, 리포터유전자의 안정적 발현에 기여하여 보다 안정적으로 테트라사이클린 계열 항생제를 탐지할 수 있다. 본 발명에서 TC를 탐지하는 염색체 기반의 바이오리포터가 보다 안정적이며 상동재조합 위치에 따른 GFP의 발현차이가 나타나는 것을 발견하였다. 또한 유기용매조건에서 플라스미드 기반의 바이오리포터보다 높은 GFP 발현을 보였다. 그 중 DR1-Tet1은 활성슬러지에 포함된 DC를 현탁액의 조건에서도 효과적으로 탐지하여 GFP 신호로 발현시킬 수 있는 것을 확인하였다. 본 발명에 의하면 TetR 조절유전자를 이용하여 현장에 적용할 수 있는 바이오센서 균주를 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0044]

상술한 바와 같이, 본 발명은 하수처리장에서 발견한 새로운 플라스미드 pAST2의 테트라사이클린 저항성 유전자를 이용하여 미량의 테트라사이클린계 항생제에 특징적으로 반응하는 바이오리포터 플라스미드 및 바이오센서를 제공한다. 따라서 테트라사이클린 계열 항생제를 특징적으로 신속, 정확하고 효율적으로 탐지할 수 있는 효과를 도모할 수 있고, 특히 본 발명에 의한 바이오리포터는 나노몰(nano-molar concentrations) 수준의 DC를 탐지할 수 있는 민감도를 가진다.

[0045]

또한 유기용매 존재 등 오염된 환경에서 저항성을 지니는 아시네킨박토 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1)를 호스트 균주로 사용하여 유기용매 존재 등 오염된 환경에서도 안정적으로 테트라사이클린 계열 항생제를 탐지할 수 있다.

[0046]

나아가 본 발명에 의한 리포터 플라스미드를 아시네킨박토 올레이보란스 DR1(*Acinetobacter oleivorans* DR1) 균주의 염색체에 상동재조합 하여 안정적으로 테트라사이클린 계열 항생제를 탐지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047]

도 1a는 본 발명에 의한 플라스미드-기반 바이오리포터(pRKTTet 및 pBBRTet)의 구조를 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 1b는 본 발명에 의한 염색체-기반 바이오센서 균주의 구조를 개략적으로 나타낸 도면이다. 각 염색체 영역은 DR1 계놈에서의 재조합 위치를 나타내고, 3개의 바이오센서 균주가 고안되었고(*A. oleivorans* DR1-Tet1 (AOLE_13040), *A. oleivorans* DR1-Tet2 (AOLE_14515), and *A. oleivorans* DR1-Tet3 (AOLE_17915)), 재조합 위치는 각 선형지도(liner map) 상에 유전자 크기와 함께 표시됨.

도 2는 테트라사이클린에 대한 본원발명의 플라스미드-기반 바이오센서의 반응을 나타내는 도면이다. a. 테트라사이클린에 대한 GFP 강도의 정량 분석 결과; b. 테트라사이클린 존재하에서 4개의 바이오센서 균주의 성장률. DR1은 30 °C에서, *E. coli*는 37 °C에서 성장됨. 각 균주의 성장률은 600 nm에서 배양액의 광학밀도(optical density, OD) 측정하여 모니터링됨; c. *tetR* 유전자의 복제수를 *tetR*/16s rRNA 유전자 비율로 나타냄. 대수성장기($OD_{600} = \sim 0.4$)에 세포에 테트라사이클린 (0.5 및 20 μ M)이 추가됨. 모든 데이터는 동일한 조건(1 시간 반응)하에서 얻어짐. GFP 정량분석 시, 실험 조건에 따른 다른 성장률은 OD_{600} 에 대한 흡광도를 정규화하여 보정되었음. Student's t-test을 이용하여 통계분석을 함. *E. coli* 균주는 각 그룹간에 유의한 차이($p = 0.0001 \sim 0.001$)를 나타내는 반면, DR1 균주는 플라스미드에 따라 다양한 상관관계를 가짐. 균주 DR1 (pBBRTet)는 대조군과 0.5 μ M 사이에 유의한 차이를 나타냄. DR1 (pRKTTet)의 경우 TC-미처리 및 0.5 μ M TC-처리 세포는 20 μ M TC-처리 세포와 유의한 차이가 있음 ($p = 0.002$).

도 3은 *tetR* 유전자 및 16S rRNA의 PCR 산물로부터 Ct 값 및 공지의 DNA 농도를 이용하여 작성된 표준곡선을 나타낸 도면이다. a. 플라스미드(pAST2)의 복제수의 표준곡선. *tetR* 유전자는 pAST2의 복제수를 산정하기 위해 이용됨. pAST2는 *EcoRI*으로 절단되어 선형 DNA로 만들어져 주형으로 사용됨. b. 16 rRNA 유전자 복제수의 표준곡선. *A. oleivorans* DR1에서 유래된 16s rRNA의 PCR 산물은 pGEM-T 벡터로 클론되어 대장균(*Escherichia coli* Top10)으로 형질전환됨. 분리된 클론 플라스미드는 절단되어 주형으로 사용됨.

도 4는 테트라사이클린에 반응한 GFP의 정량분석 결과를 나타낸 도면이다. 4개의 바이오센서 균주는 a DR1 (pRK Tet); b Top10 (pRK Tet); c DR1 (pBBRTet); d Top10 (pBBRTet)로 나타냄. 세포는 다양한 농도의 테트라사이클린(0.05~50 μ M)이 첨가된 LB (*E. coli* strains) 또는 NB (DR1 strains) 배지에서 배양됨.

도 5는 다양한 항생제에 대한 GFP 형광도를 정량분석한 결과를 나타낸 도면이다. 4가지 바이오센서 균주는 a DR1 (pRK Tet); b Top10 (pRK Tet); c DR1 (pBBRTet); d Top10 (pBBRTet)로 나타냄. 세포는 다양한 농도(0.05~50 μ M)의 테트라사이클린(tetracycline, TC), 독시사이클린(doxycycline, DC), 옥시테트라사이클린(oxytetracycline, OTC), 또는 클로르테트라사이클린(chlortetracycline, CTC)이 첨가된 LB (*E. coli* strains) 또는 NB (DR1 strains) 배지에서 1시간 동안 배양됨. 실험 조건에 따른 다른 성장률은 OD₆₀₀에 대한 흡광도를 정규화하여 보정되었음

도 6은 독시사이클린에 대한 GFP 형광도의 정량분석 결과를 나타낸 도면이다. 4가지 바이오센서 균주는 a DR1 (pRK Tet); b Top10 (pRK Tet); c DR1 (pBBRTet); d Top10 (pBBRTet)로 나타냄. 세포는 다양한 농도(0.005~50 μ M)의 독시사이클린(doxycycline, DC)이 첨가된 LB (*E. coli* strains) 또는 NB (DR1 strains) 배지에서 배양됨. 실험 조건에 따른 다른 성장률은 OD₆₀₀에 대한 흡광도를 정규화하여 보정되었음

도 7은 테트라사이클린 또는 독시사이클린을 함유하는 배지에서의 *tetH*의 상대적 유전자 발현 수준을 나타내는 도면이다. 대수성장기에 TC(0.05 μ M) 또는 DC(0.05 μ M)을 함유하는 영양 배지의 pAST2를 포함하는 DR1에 대해 qRT-PCR 분석이 실시됨. DC 함유 배지의 경우, 균주 DR1 (pAST2)는 대조군에 비해 4 배 이상 높은 발현을 나타냄. TC의 경우, pAST2를 포함하는 균주 DR1은 2.5 배 높은 *tetH* 발현을 나타냄. Student's t-test을 이용한 3 개의 샘플에서 DC-처리된 세포들간에 통계학적으로 유의한 차이가 관찰됨($p = 0.004$)

도 8은 독시사이클린에 노출된 염색체-기반 바이오센서 균주의 GFP 형광도를 정량분석한 결과를 나타낸 도면이다. a. 다양한 시점에서의 GFP 강도; b. 대수성장기에서(OD₆₀₀ = ~0.4) 다양한 농도의 DC(0~10 μ M)에 반응한 DR1-Tet1 세포의 염색(propidium iodide) 및 GFP 정량분석 결과. c. DR1-Tet1의 생존 분석(Survival assay) 결과. 가장 높은 GFP 형광도를 나타낼 때(DC 0.1 μ M), 죽은 세포는 84%이고 살아있는 세포는 16%임.

도 9는 바이오센서 균주에 대한 헥사데칸 및 톨루엔의 노출 결과를 나타내는 도면이다. a. 대수성장기에서(OD₆₀₀ = ~0.4) 헥사데칸의 다양한 처리 조건(0~30%)하에서의 세포 생존도(%). b. 대수성장기에서(OD₆₀₀ = ~0.4) 톨루엔의 다양한 처리 조건(0~30%)하에서의 세포 생존도(%). 세포 손실은 생존 세포 수의 비율(CFU/ml)로 측정됨. c. 대수성장기에서(OD₆₀₀ = ~0.4) 2시간 동안 10% 헥사데칸 또는 0.2% 톨루엔과 1 μ M 독시사이클린의 존재하에서 GFP 정량분석한 결과. 다양한 용매 농도에서의 GFP 신호를 탐지하기 위해 독시사이클린이 사용됨. 3개의 바이오센서, Top10 (pBBRTet), DR1 (pBBRTet), 및 *A. oleivorans* DR1-Tet1가 용매가 첨가 조건하에서 적용됨.

도 10은 활성 슬러지에서 독시사이클린에 대한 GFP 형광도의 정량분석 결과를 나타낸 도면이다. 합성 슬러지 샘플이 DC를 탐지하기 위해 DR1-Tet1에 첨가됨.

도 11은 활성화된 슬러지에서 DC를 탐지하기 위해 DR1-Tet1을 적용한 결과를 나타낸 도면이다. a. DC-함유 합성 슬러지 샘플(composite sludge samples)의 GFP 정량분석 결과. DC는 0~100 μ M 마이크로코즘(10 ml)을 만들기 위해 첨가됨. 대조군은 슬러지에 적용되지 않은 세포 배양을 나타냄. 다양한 농도의 DC를 함유하는 활성 슬러지(1%)가 2시간 동안 대수성장기(OD₆₀₀ = ~0.4)의 DR1-Tet1 배지 5 ml에 첨가됨. 바이오리porter 세포 배양의 최종 DC 농도는 0~5 μ M임. b. 슬러지가 적용되지 않은 세포 배양 및 슬러지(DC)가 첨가된 세포 배양의 성장률을 나타냄. 정량 데이터(GFP intensity and OD₆₀₀)는 2개의 독립적인 배양을 통해 얻어짐.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048]

이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0049]

실험 재료 및 방법

[0050]

1. 호스트 균주의 배양, 항생제 첨가 및 플라스미드의 분리

[0051]

본 발명에 사용된 호스트 균주와 플라스미드를 표 1에 표시하였다. 헥사데칸 분해 균주인 *A. oleivorans* DR1은 영양배지 (Marine BioProducts, Canada)에서 30 °C, 220 rpm으로 교반 배양되었다. *E. coli* 균주는 LB에서 37 °C, 220 rpm으로 배양되었다. 이와 같은 조건으로 야생형 균주와 플라스미드를 포함한 균주는 동일한 조건으로 배양되었다. 항생제는 영양배지에 50 µg/ml 암피실린(ampicillin), 50 µg/ml 카나마이신(kanamycin), 20 µg/ml 테트라사이클린(tetracycline)이 최종 농도로 첨가되었다.

[0052]

본 발명자들에 의해 *tetH-tetR*를 가진 새로운 TC 저항성 플라스미드 (pAST2)가 활성슬러지로부터 추출되었다 (*Microbial Ecology*, doi:10.1007/s00248-013-0343-8). 이 플라스미드는 바이오포터 플라스미드 제작과 qRT-PCR 분석에 사용되었다. 플라스미드 서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank에 KC734561으로 등록되어있다. DR1 균주는 Korea Collection for Type Cultures (KCTC 23045)와 Japan Collection of Microorganisms (JCM 16667)에 등록되어 있다. 전체서열은 GenBank (accession no. CP002080)에서 확인할 수 있다.

표 1

Table 1 Bacterial strains, plasmids and primers used in this study.

Bacterial strain/plasmid	Description	Reference
Strains		
<i>E. coli</i> Top10	F- ara D 139△(ara, leu) 7697 △lacX74 galU galK rpsL (StrR) deoR ø80dlaCZ△ M15 endA1 nupG recA1 mcrA △(mrr-hsdRMS mcrBC)	Invitrogen
<i>E. coli</i> Top10 (pBBR1MCS2gfp)	Insertion of pBBR1MCS2gfp into <i>E. coli</i> Top10	This study
<i>E. coli</i> Top10 (pRKTet)	Bioreporter, The <i>tetR-P_{tet}::gfp</i> fusion in <i>E. coli</i> Top10	This study
<i>E. coli</i> Top10 (pBBRTet)	Bioreporter, The <i>tetR-P_{tet}::gfp</i> fusion in <i>E. coli</i> Top10	This study
<i>E. coli</i> S17-1λpir	Tra ⁺ R6K strain, used for transformation	Simon et al. (1983)
<i>E. coli</i> S17-1λpir (pVIKTet)	The <i>tetR-P_{tet}::gfp</i> fusion in <i>E. coli</i> S17-1λpir	This study
<i>A. oleivorans</i> DR1	Wild type, non-naphthalene degrader, diesel oil degrader	This study
<i>A. oleivorans</i> DR1 (pAST2)	Wild type strain DR1 harboring novel plasmid type 2 from activated sludge	This study
<i>A. oleivorans</i> DR1 (pRK415gfp)	Insertion of pRK415gfp into <i>A. oleivorans</i> DR1	This study
<i>A. oleivorans</i> DR1 (pRKTet)	Bioreporter, The <i>tetR-P_{tet}::gfp</i> fusion in <i>A. oleivorans</i> DR1	This study
<i>A. oleivorans</i> DR1 (pBBRTet)	Bioreporter, The <i>tetR-P_{tet}::gfp</i> fusion in <i>A. oleivorans</i> DR1	This study
<i>A. oleivorans</i> DR1 -Tet1	whole-cell bioreporter, Insertion of pVIKTet-D1	This study
<i>A. oleivorans</i> DR1 -Tet2	whole-cell bioreporter, Insertion of pVIKTet-D2	This study
<i>A. oleivorans</i> DR1 -Tet3	whole-cell bioreporter, Insertion of pVIKTet-D3	This study
Plasmids		
pAST2	Novel plasmid type 2 isolated from activated sludge	This study
pRK415gfp	Broad-host-range vector, Tet ^R , mob ⁺	Yin et al. (2003)
pRKTet	Bioreporter plasmid, Insertion of <i>tetR-P_{tet}::gfp</i> region	This study
pBBR1MCS2	Kanamycin resistance gene, Broad-host-range vector	Kovach et al. (1994)
pBBRMCS2gfp	Insertion of full-length <i>gfp</i> region in pRK415gfp	This study
pBBRTet	Bioreporter plasmid, Insertion of <i>tetR-P_{tet}::gfp</i> region	This study
pVIK112	R6KoriV, suicide vector, <i>lacZ</i> fusion	Kalogeraki and Winans (1997)
pVIKTet	Insertion of <i>tetR-P_{tet}::gfp</i> region in pVIK112	This study
pVIKTet-D1	Insertion of AOLE_13040 gene in pVIKTet	This study
pVIKTet-D2	Insertion of AOLE_14515 gene in pVIKTet	This study
pVIKTet-D3	Insertion of AOLE_17915 gene in pVIKTet	This study
pGEM-T	pGEM-T easy vector, ampicillin marker	Promega
Primers		
pBBRTet-gfp-F	CGC TCT AGA TGA GAT CCT AAA AAT CTA TCA	This study
pBBRTet-gfp-R	CGC GAG CTC TTA TTT AGC GCT CTT TAA TAC	This study
pRKTet-gfp-F	CGC GGA TCC TGA GAT CCT AAA AAT CTA TCA	This study
pRKTet-gfp-R	CGC GAA TTC TTA TTT AGC GCT CTT TAA TAC	This study
GFP-F	TTG TTG AAT TAG ATG GCG ATG TTA	This study
GFP-R	TTT GGA AAG GGC AGA TTG TGT	This study
AOLE_13040-F	CGC CCC GGG ATG GCC TTA ATT AAT TGT AAA	This study
AOLE_13040-R	CGC GGT ACC CTA AGG TGC TTT AGC CAA CCG	This study
AOLE_14515-F	CGC CCC GGG TTA AAG GAT CTG AAT TTC CTC	This study
AOLE_14515-R	CGC GGT ACC ATG AAT CAT CCC GAC TCG GTT	This study
AOLE_17915-F	CGC CCC GGG TTA TCG ACC AGC TAA ACC ATT	This study
AOLE_17915-R	CGC GGT ACC ATG AAC TTT CTAAAA CAA TCA	This study
16s rRNA-341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Watanabe et al. (2001)
16s rRNA-534R	ATT ACC GCG GCT GCT GGC A	Watanabe et al. (2001)
tetH-pAST2-F	AGC GAC AAT CGC CTG AAA GA	This study
tetH-pAST2-R	AAT TCC TGC CAC CAT CTG GG	This study
tetR-pAST2-F	GCC GAA TGA AAC ATG GCA GG	This study
tetR-pAST2-R	CCG CAT GAA TTT TGC CAC CA	This study

[0053]

[0054]

2. 플라스미드 pRK415와 pBBRTet에 기반한 TC에 반응하는 바이오리포터 균주의 제작

[0055]

광범위 호스트 적용성 벡터(broad-host-range vector)인 pRK415(GenBank: EF437940.1; Yin et al., Appl. Environ. Microbiol. 2003)와 pBBR1MCS2(Kovach et al., 1995, Gene, 166:175-176)가 리포터 플라스미드를 제작하는 데 사용되었다. *tetR* 유전자와 *tetH* 프로모터 부분을 포함하는 서열이 PCR 방법으로 증폭되었다. 이때, pRK415-gfp-F/pRK415-gfp-R 및 pBBR1MCS2-gfp-F/pBBR1MCS2-gfp-R 프라이머 세트 (표 1)를 이용하였다. PCR은 세 단계로 진행되었다. (1) 1 사이클: 94 °C에서 15분 (2) 35 사이클: 94 °C에서 45초, 60 °C에서 45초, 72 °C에서 45초 (3) 1 사이클: 5 분. 증폭된 PCR 산물은 젤-전기영동 (gel electrophoresis)으로 확인되었다(Kang et al. 2007).

[0056]

첫째로 pRK415-gfp-F/pRK415-gfp-R에 의해 증폭된 서열 (715 bp)은 *Bam*HI/*Eco*RI의 제한효소 자리에 pRK415gfp vector에 삽입되어 pRK415를 제작하였다. 플라스미드는 Dyne Plasmid Miniprep Kit (DYNEBIO, Korea)을 이용하여 추출되었다. 제작된 플라스미드는 Micropulser (Bio-Rad, USA)를 이용하여 전기천공법으로 *E. coli* Top10과 *A. oleivorans* DR1에 주입되었다. 두 가지 균주의 50 µl competent cell에 2.5 µl 플라스미드 DNA가 첨가되었고, Micropulser (Bio-Rad, USA)에 의해 3.0-3.5 ms의 시정수영역(time constant range)과 4.5-5 kV의 정전압(constant voltage)으로 삽입되었다.

[0057]

두 번째로 pRK415gfp에서 유래된 *gfp*의 전체서열은 pBBR1MCS2 vector의 *Bam*HI/*Hind*III의 제한효소 자리에 클로닝되어 pBBR1MCS2gfp를 제작하였다. *gfp* 유전자의 삽입 여부를 확인하기 위해 GFP-F/GFP-R 프라이머 세트가 사용되었다.

[0058]

pBBR1MCS2-gfp-F/pBBR1MCS2-gfp-R에 의해 증폭된 서열 (715 bp)은 pBBR1MCS2gfp 벡터의 *Xba*I/*Sac*I의 제한효소 자리에 클로닝되어 리포터 플라스미드인 pBBRTet이 제작되었다. 완성된 플라스미드는 위와 같은 방법으로 *E. coli* Top10 과 *A. oleivorans* DR1에 삽입되었다.

[0059]

3. 염색체에 기반한 바이오센서 균주의 제작

[0060]

염색체 기반 바이오센서 균주의 제작을 위해 자살벡터 pVIK112(Suicide vector pVIK112, Kalogeraki and Winans, 1997)가 사용되었다. 제작된 플라스미드 pRK415는 pVIK112의 *Sma*I/*Eco*RI의 제한효소로 자리에 삽입되어 pVIKTet이 완성되었다. *A. oleivorans* DR1의 유전자인 AOLE_13040 (477 bp), AOLE_14515 (447 bp), AOLE_17915 (492 bp)가 PCR을 통해 증폭되었다. 각각은 다음의 프라이머를 사용하여 증폭되었다: AOLE_13040-F/13040-R, AOLE_14515-F/14515-R, AOLE_17915-F/17915-R primer pairs (표 1). 각각의 증폭된 서열은 pVIKTet의 *Sma*I/*Kpn*I의 제한 효소자리에 삽입되었다. 제작된 플라스미드는 *A. oleivorans* DR1에 전기천공법으로 삽입되었다. 이 방법은 2.5 µl의 DNA를 50 µl의 *A. oleivorans* DR1 competent cells에 Micropulser (4.0-4.5 ms, 5.5-6 kV)를 사용하여 진행되었다.

[0061]

4. GFP 형광도의 정량 분석(Quantification of GFP fluorescence)

[0062]

LB 배지(*E. coli* 균주) 또는 NB 배지(DR1 균주)의 리포터 균주의 오버나이트 배양액을 5 ml 새로운 배지에서 100배 희석하고, 교반하면서 배양하였다. 배양액이 대수성장기에 접어들었을 때($OD_{600} = \sim 0.4$), 다양한 농도의 항생제 [TC, doxycycline (DC), oxytetracycline (OTC), CTC, kanamycin, ampicillin, gentamicin, chloramphenicol, or norfloxacin]가 첨가되어 0.5 ~ 5 시간 배양되었다.

[0063]

유기용매에 오염된 상황을 재현하기 위해서, n-헥사데칸(n-hexadecane, Sigma, USA)과 톨루엔(toluene, Sigma)이 대수성장기 상태의 배양액에 첨가되었다. 또한 1 µM DC가 용매와 함께 첨가되어 2시간 동안 배양되었다. 1ml의 각 리포터 균주 배양액을 취해 13,000 x g으로 1분 동안 원심분리하여 세포를 수득하고 PBS으로 2번 세척하였다. 최종 1ml 배양액을 PBS로 현탁하여 Polystyrene 48-well microtiter plates (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 넣었다. 세포의 GFP는 microtiter plate reader (VICTOR³, BioRad)를 사용하여 측정되었다. 바이오리포터 균주는 안정한 GFP 발현을 여기파장(excitation wavelength, 488 nm)과 방사파장(emission wavelengths, 507-510 nm)에서 발광측정하였다. 또한 각 샘플의 OD_{600} 은 Microtiter plate reader

(PowerWaveXS; Bio-Tek, USA)를 사용하여 600 nm에서 흡광 측정되었다. 세포마다 다른 성장률은 OD₆₀₀을 통해 보정되었다. 하나의 형광 유닛(fluorescence unit)는 [(세포의 형광도-PBS 버퍼의 형광도)/세포의 OD₆₀₀]로 정의되며, 상대적 형광유닛(Relative fluorescence unit, fold)는 [세포의 형광유닛/대조군(미처리 세포)의 형광유닛]로 정의되어 계산되었다. 리포터 플라스미드를 포함하는 균주는 GFP 정량분석 후 Carl Zeiss Axio Imager microscope (ZEISS, Germany)로 관찰되었다.

5. qPCR에 의한 플라스미드 복제수 정량 분석

리포터 플라스미드를 포함하는 세균은 대수성장기 (OD₆₀₀ = ~0.4)까지 배양된 후 0.5 또는 20 μM TC로 1시간 동안 처리되었다. 접종 후, DNA는 플라스미드 및 염색체 DNA 모두 추출할 수 있는 genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)를 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 추출되었다. 플라스미드 복제수를 확인하기 위해, 배양액으로부터 플라스미드 DNA가 추출되었다. DNA 농도는 Biophotometer (Eppendorf, Germany)를 이용하여 측정되었다. 희석된 주형 DNA (100 ng)는 *tetR* 및 16S rRNA를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 이용하여 qPCR 되었다(표 1 참조). 25 μl의 반응액 (12.5 μl iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA), 5 μl aliquots of the DNA samples, and 2 μl forward and reverse primers)을 포함하는 96-웰 플레이트(Axygen, USA)에서 PCR이 수행되었다. PCR 조건은 다음과 같다: 95 °C에서 3분 후 35 사이클 (95 °C에서 23초, 59 °C에서 23초, 및 72 °C에서 23초).

tetR 유전자 및 16S rRNA의 PCR 산물로부터 Ct 값 및 공지의 DNA 농도를 이용하여 표준곡선이 작성되었다(도 3). 염색체(16S rRNA gene)의 복제수에 대한 정규화 이전에 표준곡선은 표적유전자(*tetR*)의 복제수를 산정하기 위해 이용되었다. *A. oleivorans* DR1의 플라스미드(pAST2)는 *EcoRI*로 절단되어 선형 DNA로 만들어져 주형으로 사용되었다(도 3의 a). *A. oleivorans* DR1에서 유래된 16S rRNA의 PCR 산물은 pGEM-T 벡터(Promega, USA)로 클론되어 대장균(*Escherichia coli* Top10)을 형질전환시키는 데 이용되었다. 분리된 클론 플라스미드는 *PstI*로 절단되어 주형으로 사용되었다(도 3의 b). *tetR* 유전자 농도는 전체 세균 농도로 정규화되었다. 리포터 플라스미드 복제수는 16S rRNA 유전자에 대한 *tetR* 비율로 산정되었다. 모든 샘플은 3회 반복 분석되었다. 통계분석은 Student's t-test가 이용되었다.

6. *A. oleivorans* DR1 및 *E. coli*에 대한 4개의 다른 TCs의 MIC 측정

96-웰 폴리스티렌 마이크로티터 플레이트를 이용하여 MIC가 측정되었다 (Costar, USA). 균주는 30 °C (DR1 strains; NB medium) 또는 37 °C (*E. coli* strains; LB medium) 220 rpm으로 교반 배양되었다. 1 ml의 대수성장기의 세포 샘플이 원심분리(13,000 x g, 1 min)에 의해 수득된 후 PBS으로 2회 세척되었다. 전체 1 x 10⁶ CFU/ml이 TC (0.001-250 μM), DC (0.001-250 μM), OTC (0.001-250 μM), 또는 CTC (0.001-250 μM)가 첨가된 새로운 배지에서 접종되어 24 시간 동안 배양되었다.

7. qPCR을 이용한 유전자 발현 분석

TC 저항 유전자(*tetH* and *tetR*)를 가지는 pAST2를 DR1 균주는 대수성장기(OD₆₀₀ = ~0.4)까지 영양배지에서 30 °C에서 배양되었다. 대수성장기(OD₆₀₀ = ~0.4)의 세포는 0.05 μM TC 또는 0.05 μM DC로 처리된 후, 15 분 동안 배양되었다. 전체 RNA는 5 ml의 배양액으로부터 RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 추출되었다. PCR에 사용된 특정 프라이머는 pAST2의 *tetH* 서열에 기초한다 (표 1). cDNA는 1 μg RNA로부터 합성되었고, *tetH* 유전자를 위한 프라이머가 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)를 위한 주형으로서 사용되었다.

25 μl의 PCR 반응액에는 12.5 μl iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 2 μl의 각 프라이머 (0.5 μM), 3 μl의 cDNA, 및 5.5 μl의 증류수가 포함된다. PCR 조건은 다음과 같다: 95 °C에서 3분 후 35 사이클 (95 °C에서 23초, 59 °C에서 23초, 및 72 °C에서 23초). 각 유전자의 발현 수준은 16S rRNA-341F/16S rRNA-534R 프라이머로 정량화된 16S rRNA 발현 수준으로 정규화되었다. 상대적 정량은 3회 반복되었다. 통계분석은 Student's t-test가 이용되었다.

[0072]

8. DC로 처리된 바이오리포터 균주의 생존율 테스트

[0073]

바이오리포터 균주의 생존율이 콜로니 계수에 의해 계산되었다. 각각의 리포터 균주를 대수성장기까지 배양하여 ($OD_{600} = \sim 0.4$) 형광측정기와 동일한 조건으로 항생제 및 유기용매를 처리한 뒤 1ml 배양액을 원심분리에 의해 수득하였다($13,000 \times g$, 1 min). PBS로 2회 세척 후 $10 \mu\text{l}$ 을 1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} , 1×10^{-8} 로 990 μl PBS에 순차적으로 희석하였다. 희석액 100 μl 를 영양 배지에 도말하였다. *A. oleivorans* DR1의 경우 30 °C, *E. coli*의 경우 37 °C에 24 시간 배양하였다. 생존율은 처리구의 생균수를 (CFU/ml) 대조군 조건 (항생제 및 유기용매 무처리구)의 생균수로 (CFU/ml) 나눈 비율로 나타내었다.

[0074]

사멸된 세포는 LIVE/DEAD BacLight RedoxSensor Green Viability Kit (Invitrogen, USA)를 이용한 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide) 염색을 통해서 정량측정하였다. GFP 측정 후 1 ml의 배양액에 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide)을 (1 μl , 20 mM) 첨가하여 10분 동안 상온에 배양시켰다. 형광은 microplate reader로 측정되었다. (555 nm excitation filter, 590 nm emission filter).

[0075]

9. DC 탐지를 위한 DR1-Tet1의 슬러지에서의 적용성 평가

[0076]

활성슬러지 샘플은 2012년 7월 중랑구 물 재생센터에서 수집되었다. 활성슬러지 샘플을 테스트한 결과 샘플에 DC가 포함되지 않은 것으로 판명되어 DC 농도를 0, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20, 100 μM 로 하는 마이크로코즘 (10 ml)을 조성하였다. 이러한 활성슬러지 샘플 50 μl [1 % (v/v)]은 5 ml의 대수성장기의 DR1-Tet1 배양액 ($OD_{600} = \sim 0.4$)에 첨가되어 2시간 동안 배양되었다. 1 ml의 바이오리포터 균주는 $13,000 \times g$ 로 1 분 동안 원심분리되었고 PBS로 2번 세척되었다. 펠릿(Pellet)을 1 ml PBS로 현탁하여 48-웰 폴리스티렌 플레이트에 분주하였다. GFP 강도(intensity)와 OD_{600} 이 앞선 방법으로 측정되었다. 슬러지 샘플이 적용된 바이오리포터 배양액은 최종 DC 농도가 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 μM 가 되었다. 활성슬러지가 첨가되지 않고 다양한 농도의 DC가 첨가된 대조군 세포(control cells)는 1% DC-함유 슬러지 처리 DR1-Tet1 배양(DC-containing sludge-treated DR1-Tet1 cultures)과 비교되었다.

[0077]

실시예 1. TC에 반응하는 바이오센서 균주의 제작

[0078]

상술한 바와 같이, 본 발명자들은 *tetH-tetR*을 가진 새로운 TC 저항성 플라스미드인 pAST2를 발견하고 본 발명자들은 TC 계열 항생제에 의해 유도되는 바이오리포터를 제작하기 위해서 *tetH* 프로모터(promoter), 오퍼레이터 및 억제조절자인 TetR 조절자(regulator)를 이용하였다. 프로모터와 오퍼레이터를 포함하고 있는 *tetH*와 *tetR* 사이의 유전자간 영역(intergenic region, 91bp)은 *tetR* 억제자(repressor)에 인접해 있다(도 1a). 플라스미드 pAST2는 여러 유전자와 함께 *tetR* (624bp)과 *tetH* (1,203bp) 유전자를 포함하고 있다(표 2). 본 발명에 의한 *tetH-tetR* module에서 발견된 오퍼레이터(operator, 5'-TCT ATC AGT GAT AGA-3')는 신규한 것으로 확인되었다. *tetH-tetR* modules은 Blanco et al. (2007)에 의해 연구되었다. *tetH* 유전자 및 *tetR* 유전자의 염기서열은 TC 저항성 플라스미드를 가지고 있는 3 가지의 대표적인 가축 (주로 소, 돼지) 병원균(*Haemophilus somnus* 2336, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* 36950)로부터 분리된 대응 유전자와 일치한다는 것을 확인하였다.

[0079]

상술한 바와 같이, *gfp* 유전자의 염기서열은 이전 연구에서 밝혀진 바 있으며(Park and Park, 2011; Yin et al., 2003), 공지의 두 가지 광범위 플라스미드에 클로닝되어 pRKTet과 pBBRTet이 전사융합으로 제작되었다(도 1a).

[0080]

도 1b에 나타난 바와 같이, 단일-교차결합(single-crosslink)으로 *tetR-P_{tetH}::gfp*가 DR1 염색체(chromosome)에서 각각 3가지 유전자와 자살벡터(suicide vector)에 상동재조합 되었다. 제작된 염색체(chromosome) 기반의 바이오센서 균주는 *A. oleivorans* DR1-Tet1 (AOLE_13040), *A. oleivorans* DR1-Tet2 (AOLE_14515), *A. oleivorans* DR1-Tet3 (AOLE_17915)으로 명명되었다.

표 2

Table 2 Open reading frames (ORF) of pAST2

Gene/orf	Position	Putative Function	Closest match (Accession)	Protein identity (%)
pAST2				
<i>repB</i>	71-1063	plasmid replication protein B	<i>Psychrobacter</i> sp. DAB_AL43B, pP43BP2 (YP_006962062.1)	57
<i>mp</i>	1185-2069	transposase	<i>Mannheimia haemolytica</i> (CAD27751.1)	99
<i>tetH</i>	2410-3612	major facilitator transporter	<i>Haemophilus somnus</i> 2336 (YP_001785055.1)	100
<i>tetR</i>	3704-4327	tetracycline repressor protein tetR	<i>Acinetobacter pleuropneumoniae</i> (YP_001569045.1)	100
<i>orf1</i>	4330-5274	hypothetical protein V216_28	uncultured bacterium HHV216 (YP_006960708.1)	100
<i>orf2</i>	5274-5876	hypothetical protein PROPEN_01088	<i>Proteus penneri</i> ATCC 35198 (ZP_03802740.1)	99
<i>orf3</i>	6071-6595	conserved hypothetical protein	<i>Acinetobacter hwoffi</i> SH145 (ZP_06071073.1)	97
<i>orf4</i>	6670-7065	predicted protein	<i>Acinetobacter hwoffi</i> SH145 (ZP_06071074.1)	92
<i>orf5</i>	7040-7918	predicted protein	<i>Acinetobacter hwoffi</i> SH145 (ZP_06071075.1)	98
<i>cueR/merR</i>	8005-8370	Cu(I)-responsive transcriptional regulator	<i>Acinetobacter hwoffi</i> SH145 (ZP_06071076.1)	99
<i>orf6</i>	8631-9443	hypothetical protein E9Q_04519	<i>Moraxella catarrhalis</i> BC1 (ZP_11631515.1)	49
<i>orf7</i>	9535-9864	transcriptional regulator, XRE family	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> SK60 (ZP_05621068.1)	87
<i>orf8</i>	9855-10184	helix-turn-helix domain protein	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> SK60 (ZP_05621069.1)	84
<i>mobA</i>	10385-10543	mobilization protein A	<i>Psychrobacter</i> sp. 1501(2011) (ZP_08462213.1)	96
<i>mobC</i>	10533-10898	mobilization protein C	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1 (YP_001274382.1)	88
<i>orf9</i>	11231-11818	hypothetical protein PsycPRwf_2391	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1, pRWF101 (YP_001274369.1)	33

Positions and putative functions of open reading frames identified in plasmid pAST2; 12,019 bp.

실시예 2. TC에 대한 바이오센서 균주의 반응

상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 4가지 바이오센서 균주의 TC에 대한 GFP의 발현을 관찰하였다(도 2). 바이오센서 균주는 대수성장기에서 다양한 TC 농도에 노출되었다. 그 결과, TC에 의해 유도되는 발현은 3시간 이내에 이루어지는 것이 확인되었다(도 4). 실험 데이터로 1-2 시간의 반응시간이 가장 적합한 것으로 확인되었다.

pRK415 백본 구조체(pRK415 backbone constructs)는 높은 농도의 TC에 강력하게 발현하는 것을 볼 수 있었다 (50 μ M; 도 4의 a, b). 20 μ M TC에서, pRK415-기반 바이오리포터는 DR1과 *E. coli*에서 높은 발현을 보여주었다. 이와는 반대경향으로, pBBR1MCS2-기반 구조체(pBBR1MCS2-based constructs)는 아주 낮은 농도의 TC를 탐지할 수 있는 민감도를 보여주었다. 즉, *E. coli* 호스트에서는 30 nM TC를, DR1 호스트에는 50 nM TC를 탐지할 수 있다. 두 가지의 pBBRTet-포함 균주는 TC 0.5 μ M에서 가장 높은 값의 GFP 신호를 보여주었다 (26.2 배) (도 4의 c 및 d).

상기와 같이, 본 발명에 의한 바이오센서 균주에서 호스트(host)와 백본 플라스미드(backbone plasmid)에 따라 달라지는 균주의 성장률, GFP 형광발광의 차이 및 플라스미드 복제 수를 확인하여 도 2, 도 3 및 표 3 등에 나타내었다.

표 3

Table 3 MIC (μ M) of each species at different level of Tetracyclines

Tetracyclines	MIC (μ M) of each species at different level of Tetracyclines	
	<i>Acinetobacter oleivorans</i> DR1	<i>Escherichia coli</i> Top10
Tetracycline	>2.5	>4.5
Doxycycline	>4	>16
Oxytetracycline	>0.5	>8
Chlortetracycline	>0.5	>8

실시예 3. TC 계열 화합물에 따른 민감도 측정

4가지 바이오센서 균주는 4가지 다른 계열의 TC 계열 항생제에 대해 테스트 되었다. TC 이외의 DC, OTC, CTC가

1시간 반응조건으로 테스트 되었다 (도 5). 또한 바이오센서가 TC 계열을 선택적으로 탐지하는지를 알아보기 위해, 다른 계열의 항생제(kanamycin, ampicillin, gentamicin, chloramphenicol, and norfloxacin)들도 TC에 적용된 농도 범위(0.05~50 μ M)로 테스트하였다(미도시). 그 결과 다른 계열의 항생제에 대해서는 모두 GFP를 발현시키지 못해, 본 발명에 의한 바이오센서가 TC 계열을 선택적으로 탐지하는 것으로 확인되었다.

4 가지의 플라스미드 기반의 바이오센서에서 DC 테스트 결과 1시간 반응에서 10~30 배의 GFP 발현을 보여주었다 (도 5). 앞선 결과와 같은 경향으로, pRKTet-기반 리포터는 높은 농도의 TCs 적용에서 가장 높게 GFP 발현량을 보여주었다. 반면에, pBBRTet-기반 리포터는 낮은 농도의 TCs에 더 높은 형광신호를 낼 수 있음이 확인되었다. pBBRTet-포함 균주에서 2시간 후 0.1~0.3 μ M DC에서 30~60 배까지 GFP가 발현되었다 (도 6). 3 시간 후, GFP는 모든 조건에서 감소하는 경향을 보였다. 따라서 본 발명에 의한 바이오센서는 나노몰 (nano-molar concentrations) 수준의 DC를 탐지할 수 있는 민감도를 가지는 것으로 판명되었다 (도 6). DR1 균주에서 pAST2로부터의 *tetH* 발현을 산정한 결과 DC에 대해 더 높은 민감도를 나타내는 것으로 확인되었다(도 7).

실시예 4. *A. oleivorans* DR1에서 염색체 기반의 바이오센서 균주의 효과

염색체-기반 바이오센서는 플라스미드의 손실을 피하기 위해 적용되었다. 리포터 유전자 카세트는 임의적으로 선택한 3가지 DR1 염색체 위치에 상동재조합되었다. *A. oleivorans* DR1가 호스트 균주로 채택되었다. 그 이유는 유기용매와 같은 환경 스트레스에 저항성을 지닌 토양 세균이기 때문이다. 각각의 리포터는 AOLE_13040 (477 bp), AOLE_14515 (447 bp), AOLE_17915 (492 bp) 영역에 *tetR*-P_{tetH}::gfp 융합 유전자를 포함하는 자살 벡터 pVIKTet에 전사융합으로 상동재조합되었으며(표 4), 각각의 바이오센서 균주는 *A. oleivorans* DR1-Tet1, *A. oleivorans* DR1-Tet2, *A. oleivorans* DR1-Tet3로 명명되었다. 각각의 GFP 발현은 0.05 μ M DC에서 1시간 반응 후 최대인 것을 확인하였다(도 8의 a). 나아가, *A. oleivorans* DR1-Tet1은 DC에 대해서 가장 빠른 감도 (2.2~6.5 배, 2~3 시간 후)를 보인 반면, DR1-Tet3은 상대적으로 낮은 감도를 보였다(3.1 배). 본 발명자들은 3-시간 반응 시간이 DC (0.05~50 μ M 범위)를 탐지하기에 가장 적합한 배양시간이라고 판단하였다. DR1-Tet3을 제외하고는, 다른 두 가지 바이오센서는(DR1-Tet1 and DR1-Tet2) 유사한 발현패턴을 보였다. 이 바이오센서 중에서 DR1-Tet1은 가장 높게 GFP 발현양상을 보였다. 본 실험결과는 유전자의 상동재조합 위치에 따른 GFP 발현의 변화를 보여주었다.

GFP의 발현과 항생제에 의한 사멸관계를 규명하기 위해 대표적인 적색형광염색염료인 프로피디움 요오드화물(propidium iodide)을 이용하여 DR1-Tet1을 대상으로 실험하였다. 사멸 세포 측정은 GFP의 정량분석 후 즉시 이루어졌으며, DR1-Tet1은 항생제 농도가 증가함에 따라 높은 사멸률을 보여주었다 (도 8의 b 및 c). DR1-Tet1에서 GFP는 세포가 사멸한 뒤에도 안정적인 발현을 보여주는 것을 확인하였다.

표 4

Table 4 The recombination sites, gene size, descriptions and RNA-sequencing data

Locus_tag	Gene size (bp)	Description	Fold change value (DR1-TC/DR1)
AOLE_13040	477	hypothetical protein	1.38
AOLE_14515	447	hypothetical protein	1.07
AOLE_17915	492	hypothetical protein	1.09

Based on RNAseq report, we randomly chose three chromosomal genes in *A. oleivorans* DR1 genome which indicate mRNA expression level is unchanged state ($-2 < \text{fold change value} < 2$). The fold change value (DR1-TC/DR1) indicates the variations of chromosomal gene expression in the presence of TC (DR1-TC is the exponentially grown DR1 which were supplemented with 1 μ g/ml TC over a period of 15 min). The full length of AOLE_13040 (477bp), AOLE_14515 (447bp) and AOLE_17915 (492bp) were inserted into constructed suicide vector pVIKTet which carrying *tetR*-P_{tetH}::gfp fusion. The RNA-seq data were deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GEO site under accession number (GSE44428).

[0094]

실시예 5. 헥사데칸 및 톨루엔에 대한 바이오센서 균주의 노출 실험(유기용매 노출 실험)

[0095]

세 가지 바이오센서 균주 [Top10 (pBBRTet), DR1 (pBBRTet), and DR1-Tet1]가 유기용매와 DC가 함께 존재할 시 DC를 탐지할 수 있는지 테스트 되었다. 헥사데칸 (2~30%)과 톨루엔 (0.2~10%) 은 대수성장기의 세포($OD_{600} = \sim 0.4$)에 DC와 함께 첨가되어 2시간 동안 배양되었다(도 9의 a 및 b). 본 발명자들은 톨루엔이 헥사데칸 보다 독성이 있는 것을 두 가지 호스트(host)에서 확인하였다. 0.5%의 톨루엔은 90%의 세포를 감소시키며, 10% 헥사데칸이나 0.2% 톨루엔이 테스트하기 적합한 것으로 확인되었다. 1 μM DC를 첨가하였을 때 *E. coli* 바이오센서 균주는 DR1 균주보다 낮은 GFP 발현과 성장률(growth rate)을 보였다 (도 9의 c). 세포의 생존율의 감소는 직접적인 GFP의 발현감소로 이어지는 것을 확인하였다. 또한 강한 사멸물을 보이는 톨루엔을 첨가한 조건에서는 헥사데칸을 첨가한 균주보다 낮은 GFP 발현량을 보여주었다. 나아가, DR1-Tet1의 DC에 대한 민감도는 다른 바이오센서 균주에 비하여 월등한 것을 확인하였다 (도 9의 c). 결과적으로 DR1(pBBRTet)과 DR1-Tet1은 유기용매를 탄소원으로 이용할 수 있는 DR1 균주의 특성을 바탕으로, 유기용매조건에서 GFP 발현의 안정성 보이며, 바이오센서로서 유리하다는 것을 판단할 수 있었다. 특히 DR1(pBBRTet) 보다는 DR1-Tet1이 조금 더 높은 GFP 발현량을 보였다.

[0096]

실시예 6. 활성슬러지에서 DR1-Tet1의 DC 탐지의 적용성 평가

[0097]

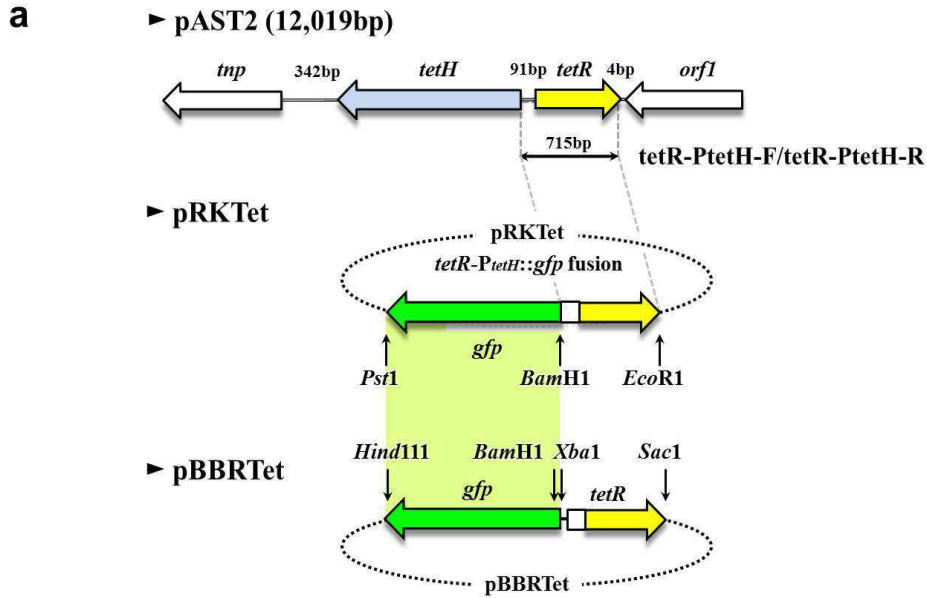
활성슬러지 샘플이 증량 물 재생 센터에서 2012년 7월에 수집되었다. Composite samples (2%)은 대수성장기($OD_{600} = \sim 0.4$)의 DR1-Tet1 균주에 적용되었다. GFP 측정결과, 활성슬러지에는 DC가 포함되지 않은 것으로 판명되었다 (도 10). 따라서 DC가 0, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20, 100 μM 농도로 마이크로코즘(microcosms, 10 ml)을 형성하였다. 활성슬러지(1%, 50 μl)는 5 ml의 대수성장기 DR1-Tet1 배양액(culture, $OD_{600} = \sim 0.4$)에 첨가되어 2시간 동안 배양되었다. 최종배양액의 DC 농도는 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 μM 로 조성되었다. GFP 발현은 DC가 첨가된 슬러지와 대조군 세포(배양액에 같은 농도가 첨가)에서 비슷한 경향으로 측정되었다 (도 11의 a). 나아가, 세포의 성장률은 슬러지가 첨가된 배양액에서 높은 것을 관찰하였다(도 11의 b). 활성슬러지는 다양한 박테리아종과 유기물질이 혼합되어있는 현탁액이므로 성장률의 증가가 발생한 것으로 추정된다. 이러한 저해작용에도 불구하고 본 발명에 의한 바이오센서 DR1-Tet1은 슬러지에서 DC를 효과적으로 탐지하는 것으로 밝혀졌다.

[0098]

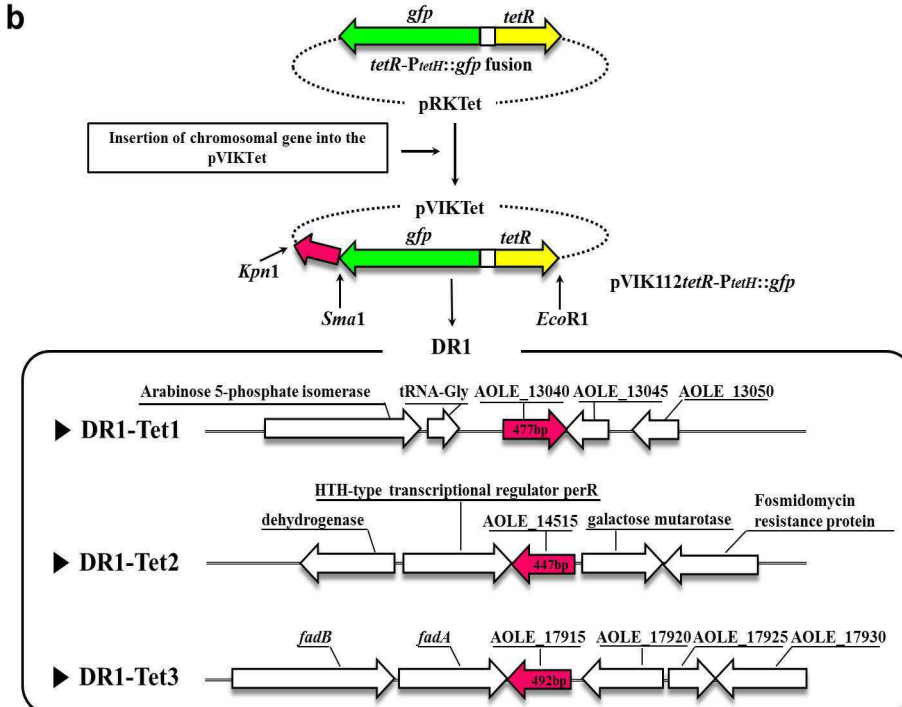
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

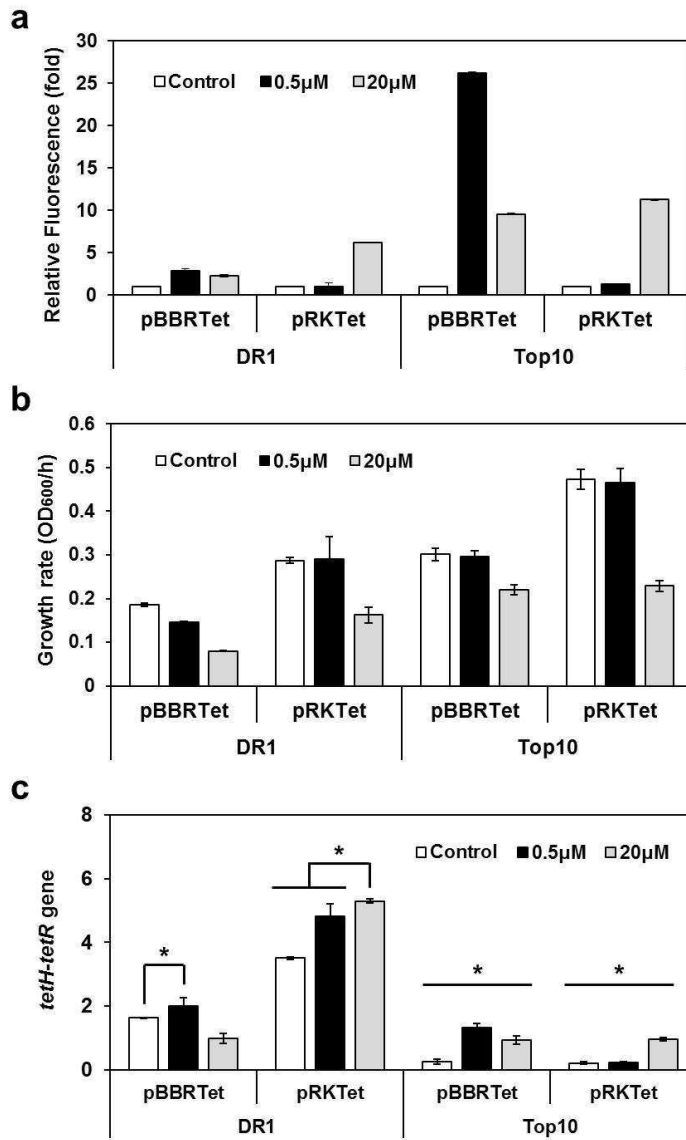
도면1a



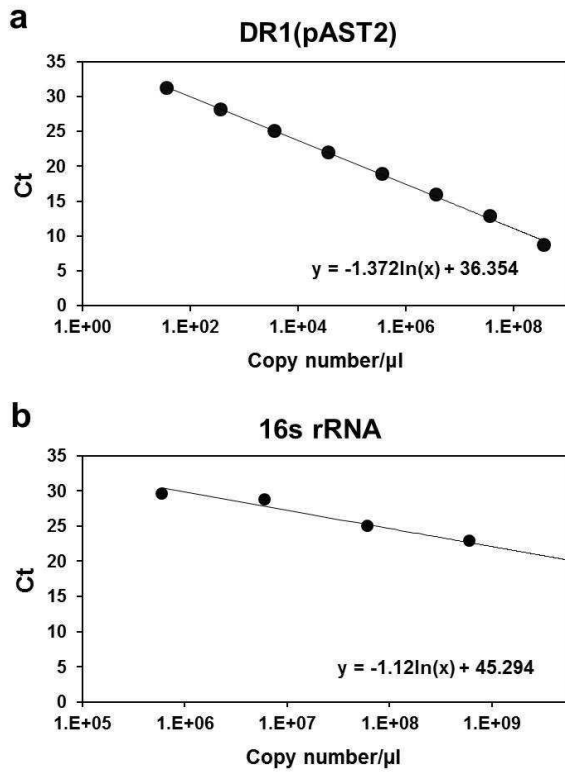
도면1b



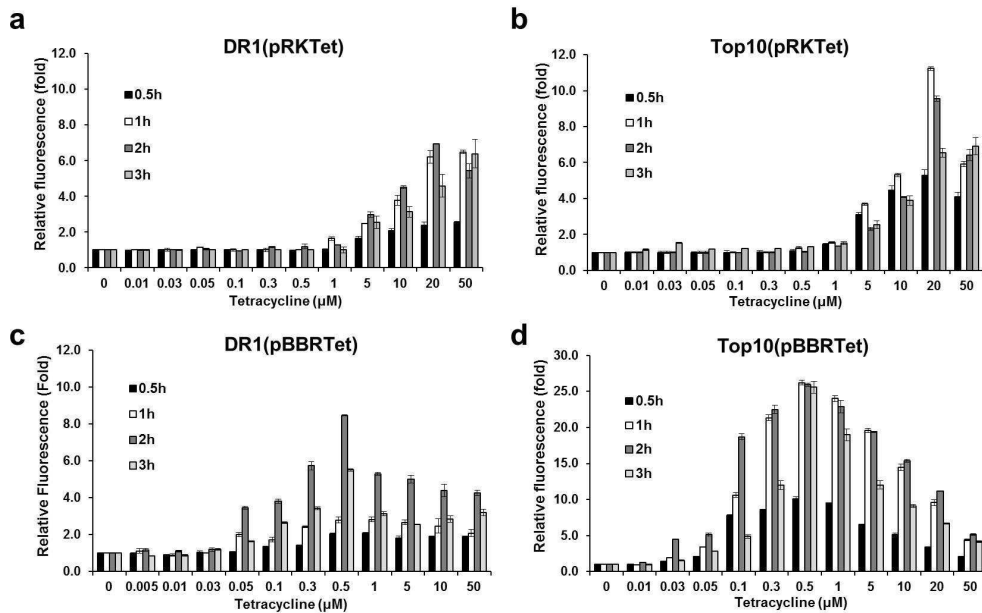
도면2



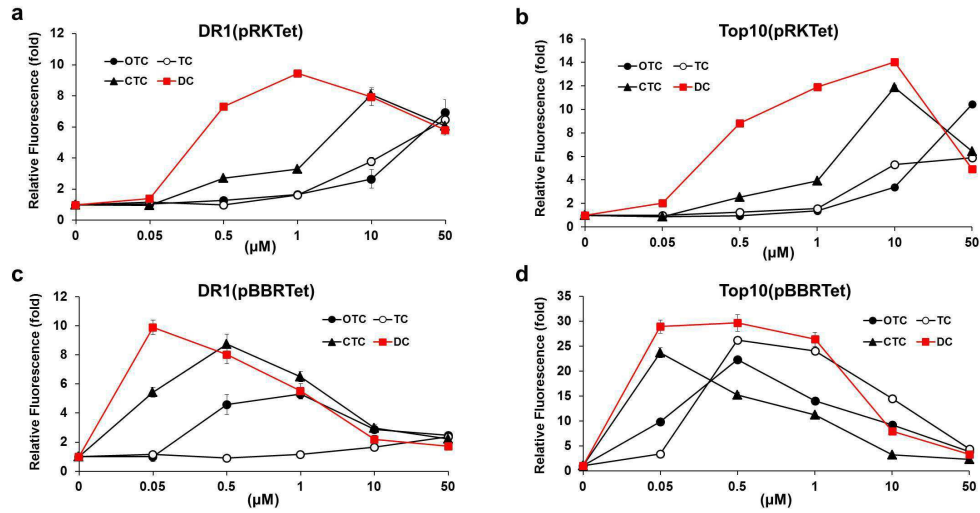
도면3



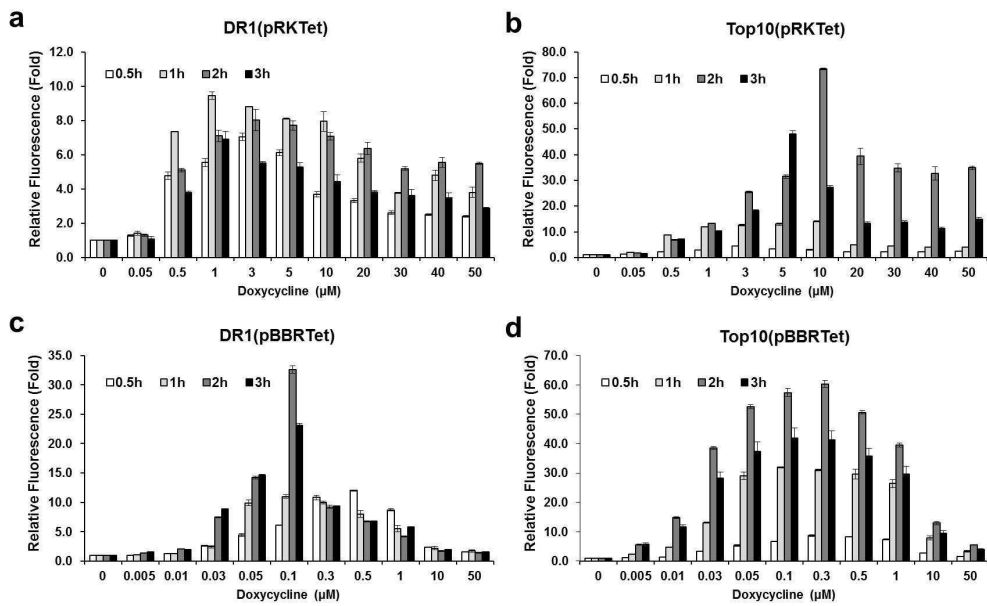
도면4



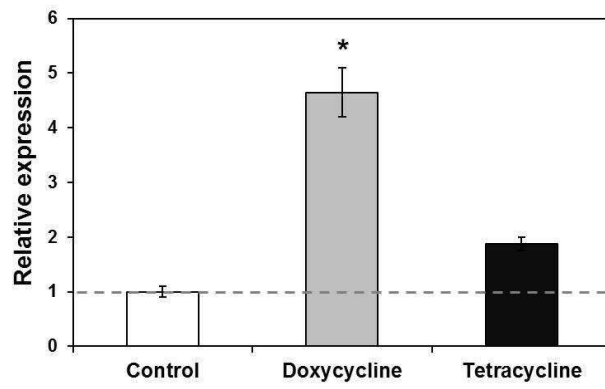
도면5



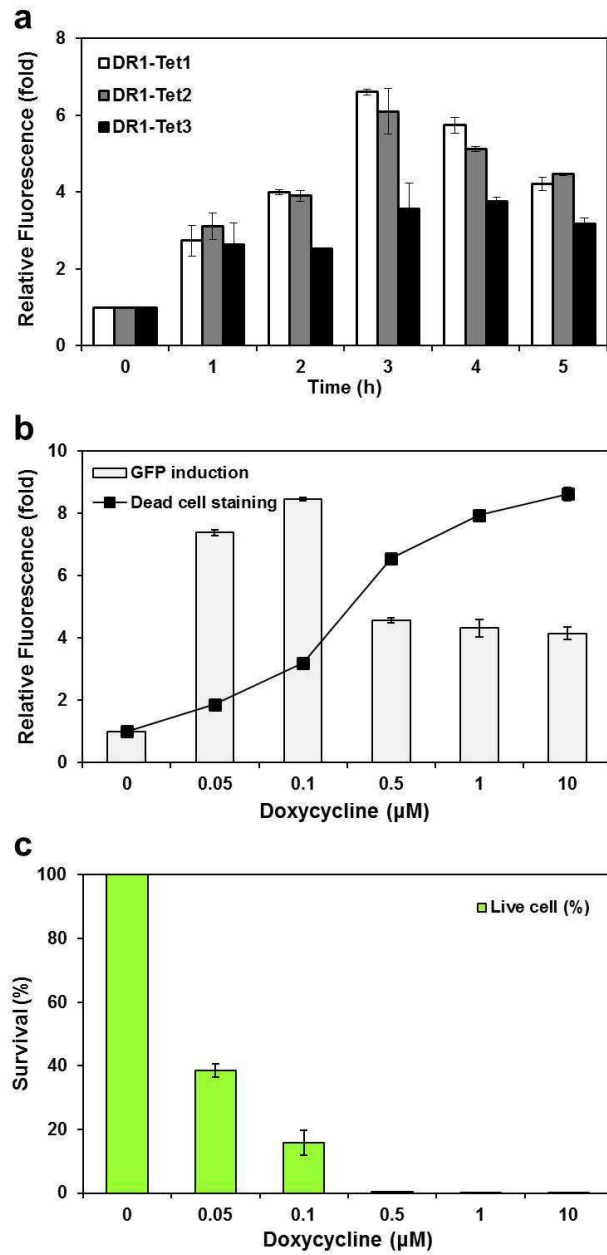
도면6



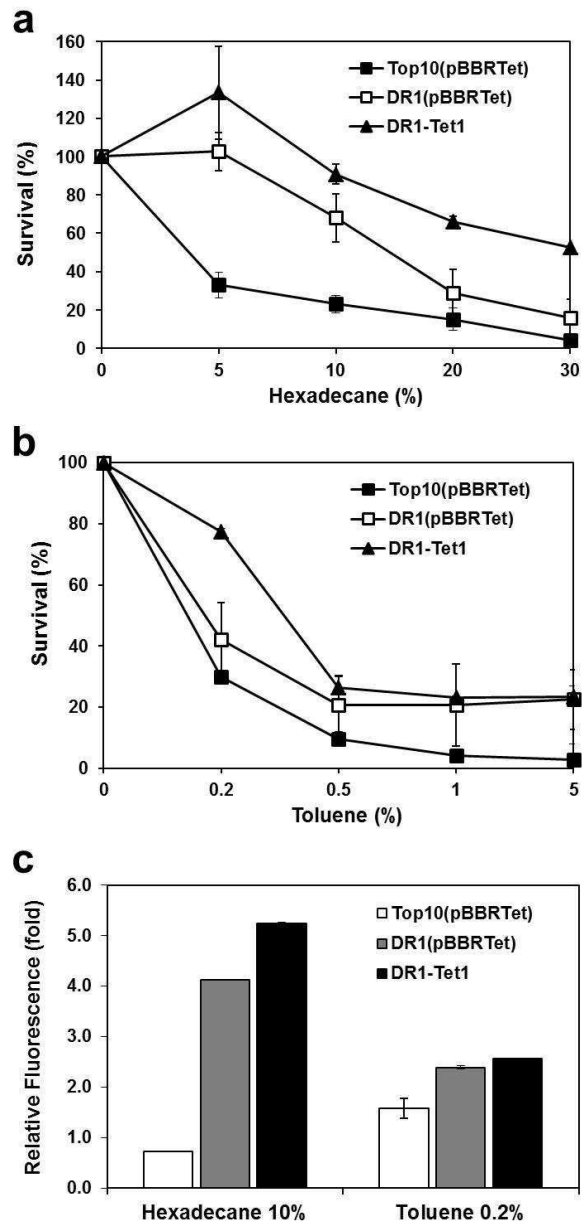
도면7



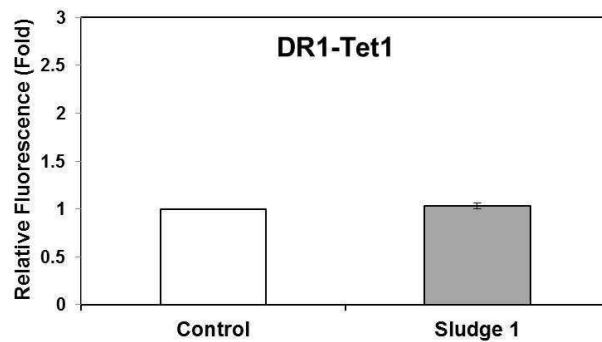
도면8



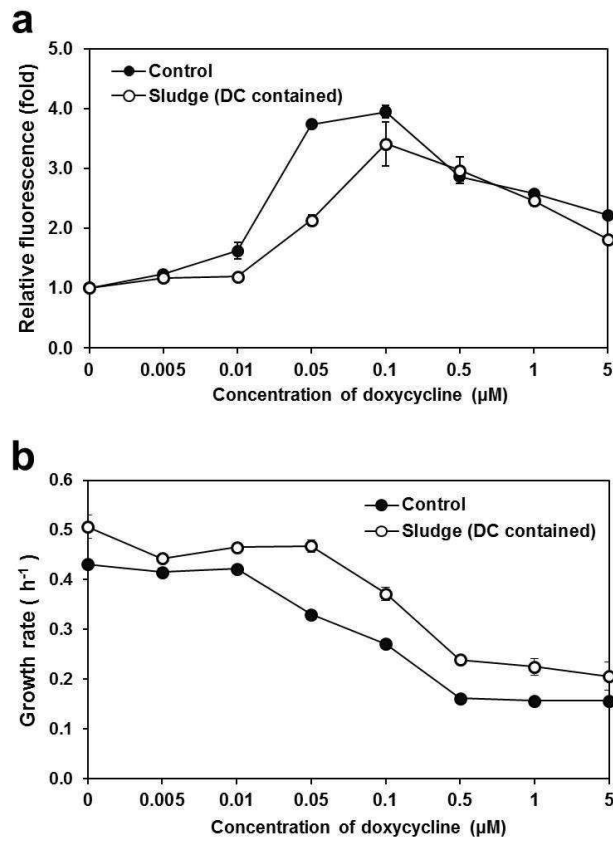
도면9



도면10



도면11



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> TetR repressor-based biosensors for the detection of tetracyclines

<130> P11-131129-01

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 12019

<212> DNA

<213> Plasmid pAST2

<400> 1

aaacttgact agatgacgac ttataagtat attgtcgtca tctagtcaag tttataggag 60

agttttaaga atggaatcca gccaaggtag cagtatgaat aatctagtgg tcaaatccaa 120

ccgattaaat acagctatac aaaatctgtc attagttgaa attaggctaa tacagctagc 180

cgttattgac agcagggaaa ctacagacagg actgacagcc gataaccctt tgcgtatatac	240
agctaagcgt tatgcggaat gctttgatgt agatgtcgat acagcttacg atgtgctttt	300
atcagcagaa gcaacacttt ttgaacgcag gttctctttt ataatgagc gcgataatca	360
agttaaaacg cgttgggtga gtcagggtga atatataaaa ggtgaaggct caattgaaat	420
aattcttacc ccagcagtggt ttaaagagat aacacgtatc gacggtttac aaacgttttt	480
tactaaatat ttgctaggac aaacagccac gctcaatagt gtatattcag ttcgacttta	540
tgagctttta attcaatggc gtaaagcgaa gaaaaccca ttatttgatt tggaaacgtt	600
cagagggtcaa ttagggttgg gggtcgatga ttacaaacgc atgagcgatt ttaagcgccg	660
cgtattagat gcagctgttg ctgagattaa cgaaaaaaca gacttgaaga tcagttatga	720
acaagaaaaa agaaaaagta cgaatcatagg gtttaaatc aaaataatta ctaagagtaa	780
acctaagcag ccacacgaaa gaaccgtaag ccgtgacgct tatacagcag atatgttcac	840
ggttgatgga ctgactgaca agcaattgtg gcgtatcagt cggcataaag agtttataag	900
tacatatagc ggtctcgcta aaggcgacgc tggttaagagc tggtcagcat atagtattt	960
tataattggt gagatcaaaa aagatgcttc caaatcagt aagaaacgtc ctatacgcga	1020
gtatttagat gggaaagaag aagactacga tttctcaagg tagcgggaaa aactgactac	1080
ctagaacagt ctgttataag cggttttctt atagtggctt gttctcggtg gtctattaat	1140
aacctgagtt cgggataaga gcttgcctaa atcattgaaa cagcttagtt ttttgcagct	1200
tgtccataag ccgacacgtt tttgagtgc ggcttaaagg gaaaccaaca gtaagcaatg	1260
agtccctgcta aaagattagc agcgaaccct gtgaagcttc gatgccttga gtgttcaatc	1320
tgacataggt ttttaagctc atcaaaaaca gtttcaatta acgagcgctc gtttaagtaac	1380
gcctcatcaa taggtttaag aatctgctgt ttcatttcc ttcgaagctt ggttataaaa	1440
tcgatattga agtcattaaa cagtttatct tttaaatctt gactgacata ccttcgatca	1500
ccaacagtt taccgaatat atcatttgct aggcctgtc tttagcggctc tctatcatct	1560
atatttcccg gagtgactct aatcgataat aactcaccgt gatgattgat aatcgctgct	1620
agttttaaac cgtaaaacca accatactt gtcttacctc tttgagcaat cccctcaaag	1680
accttatgac gcttaatccg ccggttatgg catacagata gtttgggtggc atccacaaag	1740
ctaatactg tgcaacttcc catcaagctt ttaagataag cacacaaagg cacaagagca	1800
cggggtaacta attcaataaa acgtgagtag cttggtaagt ccggaaaatc ttttttcatc	1860
atgcctagca tatgatgata gtaaaacct ttaattgac ggtaacgtaa ttgatgaaac	1920
agtaccaata tagtcattat ctctgggtaca cttatcttgc atgctcttaa tcgctttgtc	1980
ccattttcga tcagctgacg ttcaaattgt ggtttgaatg cttggtaaaa gtcgtcaatg	2040

tggcagtata attcggttag gttgtccatg taagaagtcc tttttgttga gtttttatta	2100
gtacattaac ttttaacaatt ttggacttct tttttttgcc ttttttgacc tgcttatccc	2160
gaactcaggt taaattaata atgaaatatt tgtttttttt actcagggtg aatatgattg	2220
aaaataacta tcataaaaata actatgtaac taaacgactc ccttacctgc tttatcgttc	2280
aacgccgatg tttatgattg cagccagtaa gccttgggta aaagaggctt attaattgcg	2340
ataaaaaata agtcctatca acgttattaa gagcggacag gacttttatg atctttataa	2400
tttctagtat taaggggttg aaataacagc tttagggtgtg gtttttcttt ggtgaaaaata	2460
agcggtaata agcaacatag cataaagtat tgcccccatc agccataaca gaccatccca	2520
ataagcgacg ctataactat aaataaaggc aaataaaaagg ggaccaatga tcccggtaat	2580
attggttagg ctacacagag taccttgtaa tttcccttgc gcattatcat cgacagattt	2640
tgataaataa ccttgtaatg cgggttgccc catacctcct gccgctaagc aaattaatgc	2700
tggtaagatg acccaaactg ggcctatcca cgctaataat aaacagccca tcatatcaat	2760
agacatactg atcataatgg tggttttttc gccccatttt tgtgccattt tcccagcgac	2820
aatcgctga aagaaaatat gtaatacacc cagaaccgcc aaagacatac cgatagaagt	2880
tgtgttccaa tcaaaacgat atttgttaaa cagcacccag atggtggcag gaatttgccc	2940
gataagctgg ataataaaat aggttgctaa ccaaaagtag aggcctttct taaaaaaaac	3000
agtgactgta tttgaggcag tttggttttc aggtgtccta ttggcaacaa gcgcttctct	3060
tttttgtgtt tctcgaaaaa agagcaaaga gagtattaat aatatcgagt gtgaaatagc	3120
ggcaaaaata aatggcatat gagcactgat atcacctaata aatcccccta gcattgggcc	3180
gataataagg ccaacaccaa aagcaccacc taagaaacca aaatagcgag ttcgattttt	3240
agcgggagtc acatcactca tcgctgatgc acatacggca cctgttgccg ctgtgatccc	3300
cgcaatgatg cgccaatat agagcatcca aagtgtggtt gagaatgcca ttaaaagata	3360
gtcagtgccc gcgcctaaaa gggaaaacag caagatgggt tttctgccgt atttatcaga	3420
cagtcgtcct agaataggag caaaaataac ctgcatggta gcatagagcg ctaatagcac	3480
accgtaatgg gttgccagtg aattttcact gacaaattca tttaatagag tagggagtac	3540
tggcatgata agcccgatac caatggcatc taatacgggtg atcagcagta taataataat	3600
tgattttatc attgagatcc taaaaatcta tcagtgatag agtgggtgta aaatatctct	3660
atcagtgata gattgtcaag gctattttat tttgaggtag gtaatggcaa agctagataa	3720
agaacaagtt attgataatg cgttgatttt acttaatgaa gttggtattg aaggattaac	3780
aacgcgtaag ctggcgcaaa aaatagggtg ggaacaaccc acattgtatt ggcatgtaaa	3840
aaataaacgc gctttgttag atgcattagc agaaactatt ttgcaaaagc accatcatca	3900

tgttttgccca ttgccgaatg aaacatggca ggactttttg cgaaataacg cgaaaagctt	3960
ccgccaagcc ttattaatgt atcgtgatgg tggcaaaatt catgcgggaa cacgccctc	4020
tgaaagtcaa tttagacat cagaacagca actacagttt ttgtgtgatg ctgggttttag	4080
tctatctcaa gccgtgatg cattaagctc tattgcgcat ttacatttag gctccgtact	4140
ggaaactcaa gagcatcaag aaagccaaaa agagcgtgaa aaagtagaga cggatactgt	4200
tgcctatccg ccattattaa cccaagccgt tgcaattatg gatagtata atggtgatgc	4260
tgcatttttg ttgtccttg atgtgatgat ctctggactt gaaacagtat taaagagcgc	4320
taaataaatc taaattcgct gacgcccttt ttggctaatt agttgccctt gtatgtcagc	4380
gataccaatg tgagcaatac aacctgcatt aaattgtaa tagtcatctt cgatgccatc	4440
agagaaaatt acgccattct ctggcatcaa agatcctaatt tgcagtgtg agtcaggctc	4500
aatagtgccaa aaagtcagtg caacacctgt tgttctactt ggaaatggct ctcttacct	4560
aaattgtagc ttctgatcac tccagctaaa gccttgtaat agagggtgcg aagcttctcc	4620
tgtaattgcc atgcaccag caagaataga ttgaaaccac cccgttgatc ccaatcctgt	4680
tgatacaata atgcctgatg aagattgcac ttcttcagcg ccattccatt gcaaaatata	4740
ctgtgcggaa gtgtggcttt tagggccaat aaataagtca ttaaccgcta ataaggattg	4800
accatcattg gttgttgctt gtgcaaaagt gaccgtttta aatggcattt ttttattaat	4860
ggtgttaata actgtctctt ttaattgccc tatttcaaag ggtaataatt taccatcca	4920
ccttgatgga tcaggattta tggcaatgat aggctgtcca ttaaggtatt tcagcgtatt	4980
ggcaacaagc ccatcttgac caatcaccac cacaatatcg tgaggtgaga attgatagct	5040
gggtaataag cctctttcta aaagttgaaa tcgtcctaatt gattttaaaa tcaactcagc	5100
ttctgtgagt tgcttttgat ataaattgtg ttcatlgaga taatccttta cctcaacatt	5160
gttgtgttct aaatagaatt tggtttgtga ccaggtatta aagecgtcaa ttaattcctg	5220
taagcggctt ttctcatca ccagcacaaa gcgaaaatct tcgttacgtt gcattattta	5280
ctgccttttt tcataaattg gctaaataaa tcagggtgtga tattcaactc gccgattttt	5340
cctgaattca gtgctaaggt ttcaaatgcc attgccatta attgttgtga gtccattttt	5400
gctaattgcca ttgcttttag gttctcaact ggtaattcac gataagcacg catggtagct	5460
tcaatagcat aagcatccgc ttctgattgt gttcgctgat ttccagcact taatgcgact	5520
agttctttgc gttttgcttc cgcattaaact ttggcttcaa ggctttcttt ttcaatctca	5580
gcttgttcgc gtagtaatgt acgttcgttt tctaaacgtg cttcttcaat ctcttgcgct	5640

ttacgttgaa cagataaatc ggttttcta tccagcctctt taatgggtgcg ctcttgttct	5700
actgagaatt tacgacgagc ataaatggca tcgtcggctt ctttcagtaa ggattctctc	5760
gcttcagctt ctagtgtttt taaggtttct ggtgatggtg tgattgccgc tatagagaca	5820
tctaaaatcg caatacctaa tgcctcta t gatggatgtt caattaattg ttccatcact	5880
aaagtcacta atgattggct aagtaataac gcttctctaa gtgggtgtact ttggatcttt	5940
gcttgaatta aggttattaa taggtctaag gggggggtag ttggttccct tggggtatat	6000
ccatataata tccattatat tcttagcatt tttctttagt ttaaaagcta ttaacgatca	6060
aaaattttat ctaaacatca agaattgatgc aggttgtggt ggcatgggca tataatttgc	6120
catcaggccc tacaattttg ctttcagcag tcgtctgtct cgcaccagca tgaatgactt	6180
tgccttcagc ccgtactaaa ggtgttgcca ctgtcaaagc tcgcaccata tttactttta	6240
tctctaaagt tgtgtagggt tttctgtctg gcaaaagggt atggacagcg cagccaacag	6300
cggaatctaa aagcgtgcag aaccagccgc cgtggactgt acccaatggg ttgtaatgat	6360
gacgctttgg acgcccttga aaaacggcaa tacctttttc catatggata ggagtgtagt	6420
caagtgtcag accaatagga ggatgaggca gctctcctgc aaacatagca ttaaaaatat	6480
ccataccact gcgagtgttt aagtcgtata atggaataac atcagcgtta cctagctttt	6540
ctctaatacg tgcttcttct gcttcccatg ttgctattgt ttcttcgaca ttcattttca	6600
attccttaaa acgataaata agaggttagg ctatttttat aaaggctaaa gtttcaccaa	6660
ttagtactct taatgccac ttttattttt aaagtacatc gttacatagg cgattaacca	6720
aaaggcacia attgcttgaa accagataag actgtgcata gtaacagtca tgatattatc	6780
agtctctatg ttgtagtcca gtaacgacaa caacccatt aaggcgtaca aataaagcca	6840
ccaacgtcct ttggtcatct ggcttttgac agccacaatc aggccataga taccaattgg	6900
tgtcatgacg aaccagaagg catctacaag ctgaggagat aaccaatcag gctcaggata	6960
gtgatcgaaa taaatcacat tatgaacata gtgtaaaatg ctcgaaaaca cattaagtaa	7020
tacaatgaaa atcagggttt tataatgttt gtaacggttt atcatgatgt acctgtttga	7080
tcgtctctaa aatatcttgc caaatatgag tgtttttact tctaaagtag ccaaaatgtc	7140
caactgatig gtctgagccc ctgccaatgc tatagcgttt aaaagtgatg ggttgatcgc	7200
tagtcacatt tttccaaaaa ttatgcaggt tgcgttcagt acagatttca tcatcatcgg	7260
cagtgaagac gaaagtgtgc acattaaaat tttgttaagt accaagggga atggttttcc	7320
catagaatit atctgagaaa aaaagctctt tttctcggca ccaagcacc cttcctctg	7380
taaaaccagc tggcaatct tccatgagtt tgaagctttt agccggcaca taattaaaga	7440
ctttattact aagcgggtgt aaaaaacgga aaaagaagt agccttaaga cgatagcgaa	7500

gcggcatata gctaaagtat cctgctgaga cagccactgc gattaaagca tccaattgat	7560
cagcattatg agcaaggcca acttggtgac ctccagcgct atgcctacg caatacaagg	7620
gtaagtcatt gaacaggcgc ttggctgtat cgataacagc tggaatgtcg taccgtccga	7680
tatcagaata ctgataatga caatccttta gatgactcac tttagaatcg caaaaccctc	7740
tgtaattcca tagaatgaca tggaagccat gctctcttaa atatthagca aaaggtaaat	7800
aataagaagt attggtagcg gttcctgggt ttattagaac aacggcttta ggattagcag	7860
ctttataaag agttgcacgc agctcgacgt tatcatccgt caatatatta atatccataa	7920
aaaaccctac ttgttggttaa ttaatggcta ctataaacta tggatattac tccacagtca	7980
aacgttaagt gagcgtgctc gataatgaat acaaaagaat taactgaaat agtcggatta	8040
agcagagata caattcgitt ttatgagaga gaagggttga tattgccacc atctagaaca	8100
gctaattggct atagaaacta tactaataag acagtcgacc agcttaatat gatctccatg	8160
gcgaaagagt taggttttac cttaaaagag attaaagagt taacagagct actgtataca	8220
aacaacctga cccaatcaca aatgggtgaa aagcttctag aaaaaacaa gcaaatgaa	8280
gttaagattc tagagttatc taaaatgaaa gcgttgatag atgatgcatt aaaaggcatg	8340
tgtgaatata aggataagtt ggcgctttga gaccttcta aatttttgtt aagtatttaa	8400
tctaaacgtc agttacacag aatctgggat ggtctcttca agtcctcact agcgcaccca	8460
tcatagatag aatatctatg gtaagtacat catgaagtac actgtggcta tctcagcaag	8520
ttgaaacctt aataccatta gcctacagct taaggttcta gtcctcacta ggggaccgta	8580
tcccagagatt atggtggata tgtattttaa aaatgttagc tcatatttag ttaggaaacg	8640
aaatactcta taccggtata acctacctta attgatagaa ataagagaat taaataaata	8700
gcatttctaa acttagcatt actaacacga cttcttaatt tgatacctat aaacagaaat	8760
agaattgagg cagtagtaag aatcgcaagg gttatttaact cctttgagct aaaggcta	8820
atctgatctc tcagcataat aacttgacc attttgctta acaaatagca aatattactc	8880
gctttcacia tctcatgttt gctattagt ttagaaaaca aatacatcat aagaattggt	8940
gacatggcat tggttgcacc tccgacaata cctgctacgg aaccaaaaac catcaacta	9000
actgcacctg taggtattct tagaccctta atgatgcctt tattgtcaa atatccattg	9060
ataacgtaat acagagttat cactgccatt aaaatatata ccacaccagc tggcacatat	9120
aataaaagtt ttataccaat aacactccct atcaatgatg ttagagcgag caaccaatat	9180
ttttttgagt agtaagctac ttctccta atcgctctgg tgttgtagt gaacaggact	9240
ataaaattca tgataaggct tgggaaagcc attatcgcaa ttgctttagg taggggaaaa	9300
agcatcgcca aagcgatagt acctatcatt gggaagccca ttcccgtcag accatgtacg	9360

aaggaagcaa ctgcaaatac gattagctgt aaaatatata ataatgtatc aggcatatta	9420
ctgattaaac tcaactgaac catgtctagc ttctcttttt taaatgatta acaagctctt	9480
taatattcaa gtccatatta gggaagccat cttagctacg ttgagaaaac catcttaatg	9540
agccacgcgc aacaatactt taggctcgac tttcgcaatt ttcagtagga cgctagccgc	9600
ctttgacgga ttccgcttac cttgtccca agcttgtaat gtgcaaccg atacccaag	9660
aatttcagca aattcttgtt gtgagagtcc tacattttgt ctggcttcaa cggcttcatt	9720
cacagcagtt tgctcacgta ccacgccttg ttctgcctta gcctgtctga tgctttcaag	9780
caacaagcc cctagctcat cccctgtaaa ttctgtatca gccaaagtcaa tattgtctaa	9840
gtcgttcatt gtctttattg ccatgtctct aactccttta tcaaattttt aagcacatga	9900
gcaggaatgt tttcggtttt agctttggca taaaccaaga gcataaaaat ttcaccactt	9960
tgtaatcgat tatagtaaat cgctctgacg cccccacttt taccagtgcc ctgccgagca	10020
aaacgaacct tacgaacacc gccgctttta ggaacgacat caccaatctc aggattatgg	10080
ctaataaagc tatggagtcc gccctgttct tttttggtta gtaggctatc aaccattttt	10140
atataaagcg gtgtttcaac aatggtaaac ataaatgatt ccatgtacta cattgtagta	10200
gtatagcgga ttattgatta aagtaatta ttttaattcta taaatttaag aaaaacggtc	10260
atcatagagt aaagacctca tttataataa tcttaatact taaaaatttc taattagagg	10320
cttttatgag cgataaatcg gaaatttcag atgacccctc tttgaaagaa aagcattgtc	10380
ttttctaate accaattagg tgctcagtaa gcacaggatc gccgtagagc acttttgcgt	10440
gctttcgagg tactagggta ccatcagatc ctttctcttt aagaaggtag tttaaaacgc	10500
cgttggtctt gcctttacca tgacttgaga atttaacgat cataattgta cctcgctgac	10560
ttttttgagg cccctatact cgactcgatt aacagatgta tctgttcaca tatcgctttt	10620
atcicaagca atacttgagc atctacctgt ctttctgtgt tcacatagcg agttaactga	10680
ttcaagttac tgcctattcg cccaagctgg cgtactaaat ctggatcaac tggctttaca	10740
ggtgtcacc ctaaagcaag atctcttagc caacgtgcaa ccgtacttcc tctatttctc	10800
tttttaagtt ctgtaagctc ataatcgttc actcgaatag atatctcacg agtacgtttg	10860
gctctcttat ctaaatattt agaactgttc ttggacataa taagacgcac cttaaaagat	10920
tggagggggt ttggggtctc cccaaccagc acacacaagg gataggatgt ttttagcgta	10980
gcgtaaaata gccccctgtt gtgactgctg gcttatttgt tgcaaatgac tgtctgtacc	11040
tagttggatt ttaatgtgta tacatatatta ttttctaag tctatatatg ttttacttgt	11100

atgtctatat ataaaaacaa gaatgtctat acataaaata acaactgtgt atatatatc	11160
aataaatagg tatacacata tacctgttaa ggtatgatag atactatatt gaacataata	11220
aggatcagcc atgagtgaga aacaatactc taagcgtcaa ataaatatga tgcgtgttaa	11280
tgcatthaaga agtgcttcat cagaagctaa gaatatattt atcgcttatac tttcgggagt	11340
tcatacttta gatttcgatg atgaggaagc taaaaattat cctgaagatt attatgtttt	11400
taaacaagta atagccacca taccaaatag tgaattactc catgatcaga taaacactta	11460
tagagcagct cagatatata aactactagg taccagtgtt gataataaaa agctcagttt	11520
tctaaccgct cattatgac caaaaagcag tatgtcagcc aaagaggtac taaatatcat	11580
aaaaaaggat ctgaataaat ataagctgct gtttagatgcg tttatctgta atagtcacg	11640
tagagccatt agatccttgc gatttcaaat gaaaaaagag tttggtatga ctaaggaaga	11700
tataaaggct tataaggat ttatgactat acctagtagt gttttacctt ttgttaagac	11760
ttataggaag caagaaaag agaagaaatt agttaattca aataaacctc aaagttagct	11820
atattttttt cttatttttg ttacttatcc acaacaaaa ggcttttaaat gcttttaaat	11880
gcttttaaat gcttttaaga accttggagg ctatataaaa caagggttcc gagtgagtga	11940
tgacgacatc tatcggttat gatgacgaca tctatcggtt atgatgacga catctatcgg	12000
gtatgatgac gacatctat	12019
<210> 2	
<211> 1918	
<212> DNA	
<213> Plasmid pAST2	
<400> 2	
ttaaggggtt gaaataacag ctttaggtgt ggtttttctt tggtgaaaat aagcggtaat	60
aagcaacata gcataaagta ttgccccat cagccataac agaccatccc aataagcgac	120
gctataacta taaataaagg caaataaag gggaccaatg atcccgttaa tattggtttag	180
gctcaccaga gtaccttgta atttcccttg cgcattatca tcgacagatt ttgataaata	240
accttgtaat gcgggttgcc ccataacctc tgccgctaag caaattaatg ctggttaagat	300
gacccaaacg tggcctatcc acgctaataa taaacagccc atcatatcaa tagacatact	360
gatcataatg gtggtttttt cgccccattt ttgtgccaat ttcccagcga caatcgctg	420
aaagaaaata tgtaatacac ccagaaccgc caaagacata ccgatagaag ttgtgttcca	480
atcaaaacga tatttgttaa acagcaccca gatggtggca ggaatttgcc cgataagctg	540
gataataaaa taggttgcta accaaaagta gaggttttcc ttaaaaaaaaa cagtgactgt	600

atttgaggca gtttggtttt caggtgtcct attggcaaca agcgcttctc ttttttgtgt	660
ttctcggaaa aagagcaaag agagtattaa taatatcgag tgtgaaatag cggcaaaaat	720
aatggcata tgagcactga tatcacctaa taatccccct agcattgggc cgataataag	780
gccaacacca aaagcaccac ctaagaaacc aaaatagcga gttcgatttt tagcgggagt	840
cacatcactc atcgtgatg cacatacggc acctgttgcg cctgtgatcc ccgcaatgat	900
gcgccaata tagagcatcc aaagtgtggt tgagaatgcc attaaaagat agtcgagtgc	960
cgcgccctaaa agggaaaaca gcaagatggg ttttctgccg tatttatcag acagtcgtcc	1020
tagaatagga gcaaaaataa cctgcatggt agcatagagc gctaatagca caccgtaatg	1080
ggttgccagt gaattttcac tgacaaattc atttaataga gtagggagta ctggcatgat	1140
aagcccgata ccaatggcat ctaatacggg gatcagcagt ataataataa ttgattttatt	1200
cattgagatc ctaaaaatct atcagtata gagtgggtgt aaaatatctc tatcagtgat	1260
agattgtcaa ggctatttta ttttgaggta ggtaatggca aagctagata aagaacaagt	1320
tattgataat gcgttgattt tacttaatga agttggtatt gaaggattaa caacgcgtaa	1380
gctggcgcaa aaaatagggt tggaacaacc cacattgtat tggcatgtaa aaaataaacg	1440
cgctttgtta gatgcattag cagaaaactat ttgcaaaag caccatcatc atgttttgcc	1500
attgccgaat gaaacatggc aggacttttt gcgaaataac gcgaaaagct tccgccaagc	1560
cttattaatg tatcgtgatg gtggcaaaat tcatgcggga acacgccctt ctgaaagtca	1620
atttgagaca tcagaacagc aactacagtt tttgtgtgat gctgggttta gtctatctca	1680
agccgtgtat gcattaagct ctattgcgca ttttacatta ggctccgtac tggaaactca	1740
agagcatcaa gaaagccaaa aagagcgtga aaaagtagag acggatactg ttgcctatcc	1800
gccattatta acccaagccg ttgcaattat ggatagtgat aatggtgatg ctgcattttt	1860
gtttgtcctt gatgtgatga tctctggact tgaacagta ttaaagagcg ctaaataa	1918